



(21)申請案號：111119798

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 05 月 27 日

(51)Int. Cl. : C12N15/113 (2010.01)

A61K31/713 (2006.01)

A61P1/16 (2006.01)

(30)優先權：2021/06/08

美國

63/208,299

(71)申請人：瑞典商阿斯特捷利康公司 (瑞典) ASTRAZENECA AB (SE)

瑞典

(72)發明人：林登 丹尼爾 LINDEN, DANIEL (SE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：103 項 圖式數：5 共 116 頁

(54)名稱

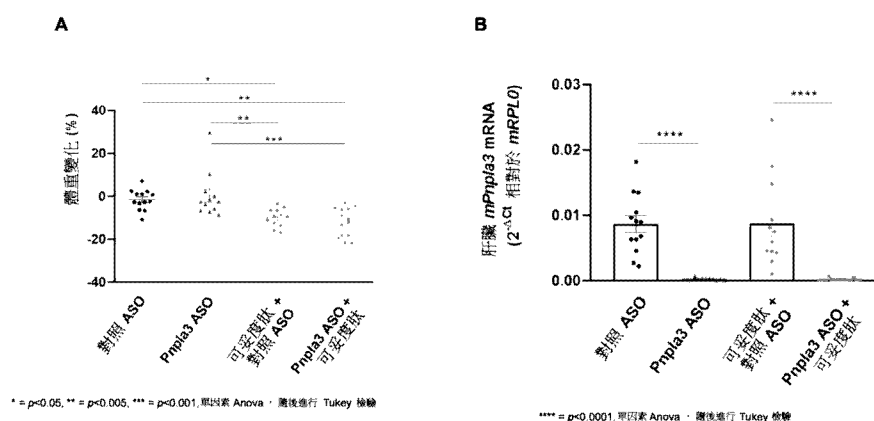
用於治療肝病之組合療法

(57)摘要

提供了治療受試者中的肝病之方法，其包括向該受試者投與：i) 含 patatin 樣磷脂酶域 3 (PNPLA3) 表現抑制劑；和 ii) 升糖素受體和/或升糖素樣肽-1 (GLP-1) 受體促效劑。還提供了藥物和套組，其包含 i) PNPLA3 表現抑制劑；和 ii) 升糖素受體和/或 GLP-1 受體促效劑。

Provided are methods of treating a liver disease in a subject, comprising administering to the subject: i) an inhibitor of patatin like phospholipase domain containing 3 (PNPLA3) expression; and ii) an agonist of glucagon receptor and/or glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor. Also provided pharmaceutical and kits comprising i) an inhibitor of PNPLA3 expression; and ii) an agonist of glucagon receptor and/or GLP-1 receptor.

指定代表圖：



【圖1】

【發明摘要】

【中文發明名稱】 用於治療肝病之組合療法

【英文發明名稱】 COMBINATION THERAPIES FOR TREATMENT OF
LIVER DISEASES

【中文】

提供了治療受試者中的肝病之方法，其包括向該受試者投與：i) 含patatin樣磷脂酶域3（PNPLA3）表現抑制劑；和ii) 升糖素受體和/或升糖素樣肽-1（GLP-1）受體促效劑。還提供了藥物和套組，其包含i) PNPLA3表現抑制劑；和ii) 升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑。

【英文】

Provided are methods of treating a liver disease in a subject, comprising administering to the subject: i) an inhibitor of patatin like phospholipase domain containing 3 (PNPLA3) expression; and ii) an agonist of glucagon receptor and/or glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor. Also provided pharmaceutical and kits comprising i) an inhibitor of PNPLA3 expression; and ii) an agonist of glucagon receptor and/or GLP-1 receptor.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 用於治療肝病之組合療法

【英文發明名稱】 COMBINATION THERAPIES FOR TREATMENT OF
LIVER DISEASES

【技術領域】

【0001】 本揭露提供了一種治療受試者中的肝病之方法，其包括向該受試者投與：i) 含patatin樣磷脂酶域3（PNPLA3）表現抑制劑；和ii) 升糖素受體和/或升糖素樣肽-1（GLP-1）受體促效劑。還提供了藥物和套組（kit），其包含：i) PNPLA3表現抑制劑；和ii) 升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑。

【先前技術】

【0002】 肝病的發病率在世界範圍內正在增加，特別是在西方國家。特別常見的是非酒精性脂肪肝病（NAFLD）。NAFLD涵蓋從脂肪變性到非酒精性脂肪性肝炎（NASH）和肝硬化的一系列肝病。NAFLD被定義為在肝臟中脂肪積聚超過按重量計5%、缺乏顯著的酒精消耗、脂肪生成藥物治療或遺傳性障礙（Kotronen等人, Arterioscler Thromb. Vasc. Biol. [動脈粥樣硬化、血栓形成和血管生物學] 2008, 28: 27-38）。

【0003】 非酒精性脂肪性肝炎（NASH）係具有炎症和肝損傷跡象的NAFLD。NASH在組織學上藉由大泡性脂肪變性、肝細胞氣球樣變性和小葉炎性浸潤來定義（Sanyal, Hepatol. Res. [肝臟病學研究] 2011. 41: 670-4）。據估計，NASH影響普通人群的2%-3%。在存在其他病變的情況下，如肥胖或糖尿病，估

計的患病率分別增加至7%和62%（Hashimoto等人, J. Gastroenterol. [胃腸病學雜誌] 2011. 46(1): 63-69）。

【0004】 PNPLA3（481個胺基酸）係含patatin樣磷脂酶域家族的成員，其在ER中和在脂滴上表現。在人中，PNPLA3在肝臟中高度表現，而在脂肪組織表現低五倍（Huang等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國國家科學院院刊] 2010. 107: 7892-7）。

【0005】 升糖素和升糖素樣肽-1（GLP-1）衍生自前升糖素原，該前升糖素原為具有158個胺基酸的先質多肽，其在組織中經過差異蛋白水解加工以形成許多種不同的升糖素原衍生肽，包括升糖素、升糖素樣肽-1（GLP-1）、升糖素樣肽-2（GLP-2）和調酸催素（OXM），它們涉及許多種生理功能，包括葡萄糖平衡、胰島素分泌、胃排空、和腸道生長，以及調節進食。升糖素係具有相應於升糖素原的胺基酸33到61（前升糖素原的53到81）的29個胺基酸的肽，而GLP-1產生為具有相應於升糖素原的胺基酸72到108（前升糖素原的92到128）的37個胺基酸的肽。GLP-1(7-36)醯胺或GLP-1(7-37)酸係GLP-1的生物活性形式，其在GLP-1受體處顯示出基本上等同的活性。

【0006】 升糖素由內分泌胰腺產生並激活升糖素受體（「GCGR」）。升糖素在肝臟中起作用經由糖異生和糖原分解而升高血糖。當血糖開始下降時，升糖素向肝臟發出信號以分解糖原和釋放葡萄糖並刺激葡萄糖的產生，導致血糖水平向正常水平升高。還顯示升糖素增加能量消耗、增加酮體產生、抑制脂肪生成並促進脂肪酸氧化、延遲胃排空並抑制食慾（Müller等人, Proc. Intl. Journal of Molecular Sciences[國際分子科學雜誌] 2020. 21(2): 383）（Boland等人, Nat Metab.[自然代謝], 2020. 2(5): 413-431）。

【0007】 GLP-1相比於升糖素具有不同的生物活性。它從腸L細胞分泌並且結合到GLP-1受體上。其活性包括通過腸促胰島素作用增強胰島素分泌、抑制升糖素分泌和抑制食物攝取。升糖素和GLP-1兩者，充當它們各自的受體處的促效劑，已經顯示出對減輕體重有效。在銷售或開發中的用於治療肥胖症的某些GLP-1類似物包括，例如，利拉魯肽（Liraglutide）（來自諾和諾德公司的VICTOZA®）和艾塞那肽（Exenatide）（來自AstraZeneca AB的Byetta®）。

【發明內容】

【0008】 本揭露關於一種治療受試者中的肝病之方法，其包括向該受試者投與：i) 含patatin樣磷脂酶域3（PNPLA3）表現抑制劑；和ii) 升糖素受體和/或升糖素樣肽-1（GLP-1）受體促效劑。

【0009】 在一些實施方式中，PNPLA3表現抑制劑係與編碼PNPLA3的核酸的區域互補的反義寡核苷酸。在一些實施方式中，反義寡核苷酸與編碼PNPLA3的核酸之核苷酸5567-5731內的位點互補。在一些實施方式中，反義寡核苷酸與編碼PNPLA3的核酸之核苷酸5644-5731內的位點互補。在一些實施方式中，反義寡核苷酸與編碼PNPLA3的核酸之核苷酸5567-5642內的位點互補。在一些實施方式中，反義寡核苷酸與編碼PNPLA3的核酸之核苷酸5567-5620內的位點互補。在一些實施方式中，編碼PNPLA3的核酸係mRNA。在一些實施方式中，反義寡核苷酸之長度為12至30個核苷。在一些實施方式中，反義寡核苷酸之長度為16至30個核苷。

【0010】 在一些實施方式中，反義寡核苷酸包含一或多個修飾的糖部分。在一些實施方式中，一或多個修飾的糖部分係2'-去氧基、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基甲基、2'-O-甲氧基乙基、2'-氟、4'-CH(CH₃)-O-2'、4'-CH₂-O-2'、4'-(CH₂)₂-O-2'

或其組合。在一些實施方式中，反義寡核苷酸包含一或多個修飾鹼基。在一些實施方式中，一或多個修飾鹼基係5-甲基胞嘧啶。在一些實施方式中，反義寡核苷酸中的每個胞嘧啶係5'甲基胞嘧啶。在一些實施方式中，反義寡核苷酸包含一或多個非天然核苷間鍵聯。在一些實施方式中，一或多個核苷間鍵聯係硫代磷酸酯鍵聯。在一些實施方式中，每個核苷間鍵聯係硫代磷酸酯鍵聯。

【0011】 在一些實施方式中，反義寡核苷酸包含具有SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9和10中任一個的至少8個連續鹼基的序列。在一些實施方式中，反義寡核苷酸包含SEQ ID No: 2、3、4、5、6、7、8、9和10中一個。在一些實施方式中，反義寡核苷酸包含：a) 由十個連接的去氧核苷組成的缺口區段；b) 由三個連接的核苷組成的5'翼區段；和c) 由三個連接的核苷組成的3'翼區段；其中該缺口區段位於該5'翼區段和該3'翼區段之間，其中每個翼區段的每個核苷包含受約束的乙基糖，其中每個核苷間鍵聯係硫代磷酸酯鍵聯，並且其中每個胞嘧啶係5-甲基胞嘧啶。

【0012】 在一些實施方式中，PNPLA3表現抑制劑還包含軛合物基團。

【0013】 在一些實施方式中，升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑係肽。在一些實施方式中，肽包含以下胺基酸序列：

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X
28GX30 (SEQ ID NO:25)

其中，

(1) X2係S，X10係Y，X12係K，X13係K，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係V，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 14) ；

(2) X2係S，X10係K，X12係E，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G（SEQ ID NO: 15）；

(3) X2係S，X10係K，X12係K，X13係Y，X15係E，X16係G，X17係Q，X18係A，X20係K，X21係E，X23係I，X24係A，X27係E，X28係K，並且X30係R（SEQ ID NO: 20）；

(4) X2係S，X10係K，X12係S，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係R，X18係S，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G（SEQ ID NO: 18）；

(5) X2係S，X10係K，X12係E，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G（SEQ ID NO: 33）；或者

(6) X2係S，X10係K，X12係S，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係R，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G（SEQ ID NO: 19）。

【0014】在一些實施方式中，肽包含胺基酸序列HSQGTFTSDKSEYLDSEARDFVAWLEAGG（SEQ ID NO: 33）。

【0015】在一些實施方式中，肽還包含對胺基酸序列中的胺基酸的修飾。在一些實施方式中，修飾係添加醯基部分。在一些實施方式中，修飾係離胺酸殘基的N（ ϵ ）基團上的棕櫚醯基部分。在一些實施方式中，棕櫚醯基通過連接基與離胺酸連接。在一些實施方式中，連接基係 γ 麩胺酸。在至少一個實施方式中，肽係HSQGTFTSDKSEYLDSEARDFVAWLEAGG（SEQ ID NO: 33），其中離胺酸經麩胺酸連接基用棕櫚醯基部分修飾。

【0016】 在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑與升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑同時投與。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑彼此間隔不到1小時投與。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑彼此間隔不到24小時投與。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑彼此間隔不到72小時投與。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑彼此間隔不到一週投與。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑彼此間隔不到兩週投與。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑腸胃外投與。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑每天投與、每天投與兩次或每天投與三次。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑每週投與、每週投與兩次或每週投與三次。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑每月投與、每月投與兩次或每月投與三次。

【0017】 在一些實施方式中，將升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑腸胃外投與。在一些實施方式中，將升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑每天投與、每天投與兩次或每天投與三次。在一些實施方式中，將升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑每週投與、每週投與兩次或每週投與三次。在一些實施方式中，將升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑每月投與、每月投與兩次或每月投與三次。

【0018】 在一些實施方式中，受試者係肥胖的和/或患有2型糖尿病。在一些實施方式中，肝病係非酒精性脂肪肝病（NAFLD）。在一些實施方式中，肝病係非酒精性脂肪性肝炎（NASH）。在一些實施方式中，肝病係肝纖維化和/或肝硬化。

【0019】 在一些實施方式中，本揭露關於減少患有肝病的受試者的肝臟中的脂肪變性之方法，其包括向該受試者投與：i) 含patatin樣磷脂酶域3 (PNPLA3) 表現抑制劑；和ii) 升糖素受體和/或升糖素樣肽-1 (GLP-1) 受體促效劑。

【0020】 在一些實施方式中，與單獨投與PNPLA3表現抑制劑或升糖素受體GLP-1受體促效劑時的總肝臟脂肪變性相比，受試者中的總肝臟脂肪變性降低。在一些實施方式中，與單獨投與PNPLA3表現抑制劑或升糖素受體GLP-1受體促效劑時的總肝臟脂肪變性相比，受試者中的總肝臟脂肪變性降低至少30%。在一些實施方式中，與單獨投與PNPLA3表現抑制劑或升糖素受體GLP-1受體促效劑時的總肝臟脂肪變性相比，受試者中的總肝臟脂肪變性降低至少30%。在一些實施方式中，肝病係非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。在一些實施方式中，肝病係非酒精性脂肪性肝炎。在一些實施方式中，肝病係肝纖維化。

【0021】 在一些實施方式中，本揭露提供了一種減少患有非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 的受試者的肝臟中的炎症之方法，其包括向該受試者投與：i) 含patatin樣磷脂酶域3 (PNPLA3) 表現抑制劑；和ii) 升糖素受體和/或升糖素樣肽-1 (GLP-1) 受體促效劑。在一些實施方式中，與單獨投與PNPLA3表現抑制劑或升糖素受體GLP-1受體促效劑時的肝臟炎症相比，受試者中的肝臟炎症減少至少50%。

【0022】 在一些實施方式中，本揭露提供了一種減少患有肝病的受試者中的肝膠原之方法，其包括向該受試者投與：i) 含patatin樣磷脂酶域3 (PNPLA3) 表現抑制劑；和ii) 升糖素受體和/或升糖素樣肽-1 (GLP-1) 受體促效劑。在一些實施方式中，與單獨投與PNPLA3表現抑制劑或升糖素受體GLP-1受體促效劑時的肝膠原相比，受試者中的肝膠原減少至少25%。

【0023】 在一些實施方式中，本揭露提供一種藥學上可接受的組成物，其包含：i) 含patatin樣磷脂酶域3 (PNPLA3) 表現抑制劑；ii) 升糖素受體和/或升糖

素樣肽-1 (GLP-1) 受體促效劑；和iii) 至少一種藥學上可接受的賦形劑。在一些實施方式中，組成物被配製用於腸胃外投與。

【0024】 在一些實施方式中，本揭露提供了一種套組，其包含：i) 含patatin 樣磷脂酶域3 (PNPLA3) 表現抑制劑；和ii) 升糖素受體和/或升糖素樣肽-1 (GLP-1) 受體促效劑。

【圖式簡單說明】

【0025】 以下附圖形成本說明書的一部分，並且被包括在內以進一步展示本揭露之某些方面的示例性實施方式。

【0026】 [圖1A]顯示了純合*Pnpla3*^{148M/M}敲入小鼠的體重變化百分比圖，該小鼠餵食誘導NASH的飲食36週，並給藥1) 對照ASO + 鹽水，2) *Pnpla3* ASO + 鹽水，3) 對照ASO + 可妥度肽 (Cotadutide)，或4) *Pnpla3* ASO + 可妥度肽治療14週，如實例1中所述。圖1B顯示同一小鼠的肝臟*mPnpla3* mRNA濃度圖，如實例1所述測量的。

【0027】 [圖2]顯示了從取自上述圖1A和實例1的小鼠的染色肝臟切片測量的總肝臟脂肪變性 (2A)、大泡性脂肪變性 (2B) 和微泡性脂肪變性 (2C) 的圖。圖2D顯示了染色切片的圖像，每個切片提供了單位面積的總脂滴百分比。

【0028】 [圖3A]顯示了從取自上述圖1A和實例1的小鼠的肝臟切片測量的肝臟巨噬細胞百分比的圖。圖3B顯示了從上述圖1A和實例1的小鼠獲得的肝臟的炎症得分圖。

【0029】 [圖4]顯示了對上述圖1A和實例1的小鼠如實例1所述計算的NAFLD活性得分 (NAS) 圖。

【0030】 [圖5]顯示了取自上述圖1A和實例1的小鼠的肝臟切片中肝膠原A1A的百分比圖。如實例1所述測量肝膠原。

【實施方式】

序列表

【0031】 本申請含有已以ASCII格式以電子方式提交且特此藉由援引以其全文併入的序列表。所述ASCII副本創建於2021年6月4日，名稱為0098-0076PR1_SL.txt並且大小為60,642位元組。

【0032】 本揭露提供了一種治療肝病如NASH和/或NAFLD之方法。在一些實施方式中，本揭露提供一種治療受試者的肝病之方法，其包含向該受試者投與：i) 含patatin樣磷脂酶域3 (PNPLA3) 表現抑制劑；和ii) 升糖素受體和/或升糖素樣肽-1 (GLP-1) 受體促效劑。

定義

【0033】 除非另外指明，以下術語具有以下含義：

【0034】 在整個本申請中，術語「約」用於指示值包括被採用以確定值的方法/裝置的誤差的固有變化，或者研究受試者之間存在的變化。典型地，術語「約」意指涵蓋近似於或小於1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%或更高變化，這取決於具體情況。在實施方式中，熟悉該項技術者將理解由術語「約」指示的可變性水平，這是由於其在本文中使用的上下文。還應理解，術語「約」的使用也包括具體列舉的值。

【0035】申請專利範圍中使用術語「或」用於意指「和/或」，除非明確指示僅指替代方案或替代方案係相互排斥的，儘管本揭露支持僅是指替代方案以及「和/或」的定義。

【0036】如本文所用，「之間」係包括範圍末端的範圍。例如，x和y之間的數值明確地包括數值x和y，以及落在x和y內的任何數值。

【0037】「2'-去氧核苷」意指包含2'-H(H)呋喃糖基糖部分的核苷，如在天然存在的去氧核糖核酸（DNA）中發現的。在某些實施方式中，2'-去氧核苷可包含經修飾的核鹼基或者可包含RNA核鹼基（尿嘧啶）。

【0038】「2'-O-甲氧基乙基」（亦稱2'-MOE）係指2'-O(CH₂)₂-OCH₃）代替核糖基環的2'-OH基團。2'-O-甲氧基乙基修飾的糖係經修飾的糖。

【0039】「2'-MOE核苷」（亦稱2'-O-甲氧基乙基核苷）意指包含2'-MOE修飾的糖部分的核苷。

【0040】「2'-取代的核苷」或「2-修飾的核苷」意指包含2'-取代的或2'-修飾的糖部分的核苷。如本文所用，關於糖部分的「2'-取代的」或「2-修飾的」意指包含除H或OH之外的至少一種2'-取代基基團的糖部分。

【0041】「3'靶位點」係指與特定化合物的最3'核苷酸互補的靶核酸的核苷酸。

【0042】「5'靶位點」係指與特定化合物的最5'核苷酸互補的靶核酸的核苷酸。

【0043】「5-甲基胞嘧啶」意指具有附接至5位的甲基基團的胞嘧啶。

【0044】「投與（administration）」或「投與（administering）」係指將在此提供的化合物或組成物引入個體體內以執行其預定功能的途徑。可以使用的投與途徑之實例包括但不限於胃腸外投與，如皮下、靜脈內、或肌內注射或輸注。

【0045】「同時投與」或「共投與」意指以任何方式投與兩種或更多種化合物，以此方式，兩種藥物的藥理作用在患者體內顯現。同時投與不要求以單個藥物組成物、以相同劑型、藉由相同投與途徑、或同時投與兩種化合物。兩種化合物的作用本身不需要同時顯現出來。該等作用僅需重疊一段時間並且不需同延。同時投與或共投與涵蓋並行地或順序地投與。

【0046】「緩解」係指相關疾病、障礙、或病症的至少一種指標、體征、或症狀的改善或減輕。在某些實施方式中，緩解包括病症或疾病的一或多種指標的進展或嚴重性的延遲或減緩。指標的進展或嚴重性可以藉由熟悉該項技術者已知的主觀或客觀量度來確定。

【0047】「動物」係指人或非人動物，包括但不限於小鼠、大鼠、兔、狗、貓、豬、以及非人靈長類動物（包括但不限於猴和黑猩猩）。

【0048】「反義化合物」意指包含寡核苷酸和視需要一或多種另外的特徵（如軛合物基團或端基）的化合物。反義化合物之實例包括單鏈的和雙鏈的化合物，如寡核苷酸、核糖酶、siRNA、shRNA、ssRNA、以及基於佔用的化合物。

【0049】「反義寡核苷酸」意指具有與靶核酸或其區域或區段互補的核鹼基序列的寡核苷酸。在某些實施方式中，反義寡核苷酸可特異性地與靶核酸或其區域或區段雜交。

【0050】「cEt」或「受約束的乙基」意指核糖基二環糖部分，其中該二環糖的第二環經由連接4'-碳和2'-碳的橋形成，其中該橋具有式： $4'\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-O-}2'$ ，並且其中該橋的甲基基團係S構型。

【0051】「cEt核苷」意指包含cEt經修飾的糖部分的核苷。

【0052】化合物中的「化學修飾」描述了相對於這樣的單位的初始狀態，通過該化合物中的任何單位的化學反應的取代或改變。「經修飾的核苷」意指獨立地具有經修飾的糖部分和/或修飾的核鹼基的核苷。「經修飾的寡核苷酸」意

指包含至少一種經修飾的核苷間鍵聯、經修飾的糖、和/或修飾的核鹼基的寡核苷酸。

【0053】「化學上不同的區域」係指化合物的在某種程度上來說與同一化合物的另一個區域在化學上不同的區域。例如，具有2'-O-甲氧基乙基核苷酸的區域在化學上不同於具有沒有2'-O-甲氧基乙基修飾的核苷酸的區域。

【0054】「嵌合反義化合物」意指具有至少2個化學上不同的區域的反義化合物，每個位置具有多個亞單位。

【0055】「軛合物基團」意指附接至寡核苷酸的一組原子。軛合物基團包括軛合物部分和將軛合物部分附接至寡核苷酸的軛合物連接基。

【0056】「軛合物連接基」意指包含將軛合物部分連接至寡核苷酸的至少一個鍵的一組原子。

【0057】「軛合物部分」意指通過軛合物連接基附接至寡核苷酸的一組原子。

【0058】在寡核苷酸的背景下，「連續」係指彼此緊鄰的核苷、核鹼基、糖部分、或核苷間鍵聯。例如，「連續核鹼基」意指在序列中彼此緊鄰的核鹼基。

【0059】「劑量」意指在單次投與中、或在指定的時間段內提供的化合物或藥劑的指定量。在某些實施方式中，劑量可以按兩個或更多個大丸劑、片劑或注射劑形式投與。例如，在某些實施方式中，在希望皮下投與的情況下，所希望的劑量可以要求不是藉由單次注射容易地提供的體積。在此類實施方式中，可以使用兩次或更多次注射達到所希望的劑量。在某些實施方式中，劑量可以按兩次或更多次注射投與，以使個體體內的注射部位反應最小化。在其他實施方式中，經延長的時間段或連續地藉由輸注投與化合物或藥劑。可以將劑量指明為每小時、每天、每週或每月的藥劑的量。

【0060】「給藥方案」係被設計為實現一或多種所希望的效果的劑量的組合。

【0061】「有效量」意指足以在對化合物有需要的個體體內實現所希望的生理學結果之化合物的量。有效量在個體之間可以根據有待治療的個體的健康和身體狀況、有待治療的個體的分類群、組成物的配方、個體的醫學症狀的評估、以及其他相關因素而變化。

【0062】「缺口體 (Gapmer)」意指寡核苷酸，該寡核苷酸包含多個核苷的內部區域，該等核苷支援被定位在具有一或多個核苷的外部區域之間的RNA酶H切割，其中該等包含內部區域的核苷在化學上不同於包含外部區域的該一個核苷或多個核苷。內部區域可以被稱作「缺口」並且外部區域可以被稱作「翼」。

【0063】「緊鄰」意指在相同種類的緊鄰元件之間不存在間插元件（例如在緊鄰核鹼基之間沒有間插核鹼基）。

【0064】「核苷間鍵聯」意指在寡核苷酸中的相鄰核苷之間形成共價鍵聯的基團或鍵。「經修飾的核苷間鍵聯」意指除天然存在的、磷酸酯核苷間鍵聯之外的任何核苷間鍵聯。非磷酸酯鍵聯在此意指經修飾的核苷間鍵聯。

【0065】「連接基-核苷」意指將寡核苷酸連接至軛合物部分的核苷。連接基-核苷位於化合物的軛合物連接基內。不認為連接基-核苷係化合物的寡核苷酸部分的一部分（即使它們與寡核苷酸鄰接）。

【0066】「錯配」或「非互補」意指當將第一和第二寡核苷酸進行比對時，該第一寡核苷酸的核鹼基不與該第二寡核苷酸或靶核酸的相應核鹼基互補。例如，核鹼基（包括但不限於通用核鹼基、肌苷、和次黃嘌呤）能夠與至少一個核鹼基雜交，但是相對於它所雜交的核鹼基仍是錯配的或非互補的。作為另一個實例，當將第一和第二寡核苷酸進行比對時，不能夠雜交到該第二寡核苷酸或靶核酸的相應核鹼基上的該第一寡核苷酸的核鹼基係錯配或非互補核鹼基。

【0067】「調節」係指改變或調整細胞、組織、器官或生物體中的特徵。

例如，調節PNPLA3 RNA可以意指升高或降低PNPLA3 RNA和/或PNPLA3蛋白在細胞、組織、器官或生物體中的水平。「調節劑」在該細胞、組織、器官或生物體中實現該改變。例如，PNPLA3化合物可為降低細胞、組織、器官或生物體中的PNPLA3 RNA和/或PNPLA3蛋白的量的調節劑。

【0068】「MOE」意指甲氧基乙基。

【0069】「非-二環經修飾的糖」或「非二環經修飾的糖部分」意指經修飾的糖部分，該糖部分包含不形成該糖的兩個原子之間的橋從而形成第二環的修飾（如取代）。

【0070】「寡聚化合物」意指包含單個寡核苷酸和視需要一或多種另外的特徵（例如軛合物基團或端基）的化合物。

【0071】「寡核苷酸」意指連接的核苷的聚合物，該等核苷中的每個核苷都可以彼此獨立地被修飾或不被修飾。除非另有說明，寡核苷酸由8-80個連接的核苷組成。「經修飾的寡核苷酸」意指寡核苷酸，其中至少一個糖、核鹼基、或核苷間鍵聯係被修飾的。「未經修飾的寡核苷酸」意指不包含任何糖、核鹼基、或核苷間經修飾的寡核苷酸。

【0072】「硫代磷酸酯鍵聯」意指經修飾的磷酸酯鍵聯，其中非橋接氧原子之一被硫原子置換。硫代磷酸酯核苷間鍵聯係經修飾的核苷間鍵聯。

【0073】「部分」意指核酸的限定數目的連續（即，連接的）核鹼基。在某些實施方式中，一個部分係靶核酸的限定數目的連續核鹼基。在某些實施方式中，一個部分係寡聚化合物的限定數目的連續核鹼基。

【0074】「RefSeq No.」係分配給序列的字母和數位的唯一組合，從而表示該序列係針對特定靶轉錄物（例如，靶基因）。關於靶基因的這種序列和資訊（統稱為基因記錄）可以在遺傳序列數據庫中找到。遺傳序列數據庫包括NCBI

參考序列數據庫、GenBank、歐洲核苷酸存文件、和日本DNA數據庫（後三者形成國際核苷酸序列數據庫合作或INSDC）。

【0075】「RNAi化合物」意指至少部分地藉由RISC或Ago2而非藉由RNA酶H起作用以調節靶核酸和/或由靶核酸編碼的蛋白的反義化合物。RNAi化合物包括但不限於雙鏈siRNA、單鏈RNA（ssRNA）、和微小RNA（包括微小RNA模擬物）。

【0076】「糖部分」意指未經修飾的糖部分或經修飾的糖部分。「未經修飾的糖部分」或「未經修飾的糖」意指如在RNA中發現的2'-OH(H)核糖基部分（「未經修飾的RNA糖部分」）或如在DNA中發現的2'-H(H)部分（「未經修飾的DNA糖部分」）。「經修飾的糖部分」或「經修飾的糖」意指修飾的呋喃糖基糖部分或糖代用品。「修飾的呋喃糖基糖部分」意指呋喃糖基糖，其包含代替未經修飾的糖部分的至少一個氫或氫基的非氫取代基。在某些實施方式中，修飾的呋喃糖基糖部分係2'-取代的糖部分。此類修飾的呋喃糖基糖部分包括二環糖和非二環糖。

【0077】「糖代用品」意指具有不同於呋喃糖基部分的修飾的糖部分，該修飾的糖部分可以將核鹼基鍵聯至另一個基團（例如在寡核苷酸中的核苷間鍵聯、軛合物基團、或端基）。包含糖代用品的經修飾的核苷可以摻入到寡核苷酸內的一或多個位置，並且此類寡核苷酸能夠與互補化合物或核酸雜交。

【0078】「治療有效量」意指為個體提供治療益處的化合物、藥劑、或組成物的量。

【0079】如本文使用的，術語「多肽」旨在涵蓋單數「多肽」以及複數「多肽」，並且包含兩個或更多個胺基酸的任何鏈或多個鏈。因此，如本文使用的，「肽」、「肽亞單位」、「蛋白質」、「胺基酸鏈」、「胺基酸序列」、或用來指代兩個或更多個胺基酸的鏈或多個鏈的任何其他術語，都被包括定義「多肽」

中，儘管該等術語的每一者都可具有更具體的含義。術語「多肽」可以用來替代任何該等術語或者與其可互換地使用。該術語進一步包括已經歷翻譯後或合成後修飾的多肽，該等修飾例如，糖基化、乙醯化、磷酸化、醯胺化、藉由已知保護/阻斷基團進行的衍生、蛋白水解裂解或藉由非天然存在的胺基酸進行的修飾。

【0080】如在此使用的，術語「序列一致性」指的是在兩個或更多個多核苷酸序列之間或在兩個或更多個多肽序列之間的關係。當一個序列中的位置被與比較序列的相應位置中的相同核酸鹼基或胺基酸佔據時，該序列被說成是與那個位置「一致」。「序列一致性」的百分比係藉由確定在這兩個序列中存在的一致核酸鹼基或胺基酸的位置的數目進行計算的，從而產生「一致」位置的數目。然後將「一致」位置的數目除以在比較視窗中的位置的總數並且乘以100而產生「序列一致性」的百分比。藉由將兩個最佳比對序列在比較視窗上進行比較來確定「序列一致性」的百分比。為了對用於比較的序列進行最優化的比對，多核苷酸或多肽序列的在比較視窗中的部分可包含被稱為空位的添加或缺失，而參照序列保持不變。最佳比對是，即使存在空位，也可在參照序列與比較序列之間生成最大可能數量的「一致的」位置的比對。可以使用國家生物技術資訊中心（National Center for Biotechnology Information）截止到2004年9月1日提供的程式「BLAST 2序列」的版本來確定在兩個序列之間的「序列一致性」百分比，該程式可與程式BLASTN（用於核苷酸序列比較）以及BLASTP（用於多肽序列比較）結合使用，該等程式基於Karlin和Altschul的演算法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA[美國國家科學院院刊]90（12）：5873-5877，1993）。當利用「BLAST 2序列」時，對於下述參數使用截止到2004年9月1日的默認參數：字長（3）、開放空位罰分（11）、擴展空位罰分（1）、空位急速下降（50）、期望值（10）以及任何其他需要的包括但不限於基質選項的參數。

PNPLA3

【0081】 在一些實施方式中，本揭露提供了一種藉由投與PNPLA3抑制劑來治療肝病之方法。PNPLA3(481個胺基酸)係含patatin樣磷脂酶域家族的成員，其在ER中和在脂滴上表現。在人中，PNPLA3在肝臟中高度表現，而在脂肪組織表現低五倍(Huang等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國國家科學院院刊] 2010. 107: 7892-7)。在一些實施方式中，PNPLA3係指SEQ ID NO: 1。「PNPLA3」意指PNPLA3的任何核酸或蛋白質。「PNPLA3核酸」意指編碼PNPLA3的任何核酸。例如，在某些實施方式中，PNPLA3核酸包括編碼PNPLA3的DNA序列、從編碼PNPLA3的DNA(包括含有內含子和外顯子的基因組DNA)轉錄的RNA序列、以及編碼PNPLA3的mRNA序列。「PNPLA3 mRNA」意指編碼PNPLA3蛋白的mRNA。靶標可以用大寫字母或小寫字母來表示。

【0082】 在一些實施方式中，本揭露提供與升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑組合用於抑制PNPLA3(PNPLA3)表現以治療肝病的方法、化合物和組成物。本文提供的某些實施方式涉及藉由投與PNPLA3抑制劑治療肝病之方法。

「PNPLA3特異性抑制劑」可指能夠在分子水平上特異性地抑制PNPLA3 RNA和/或PNPLA3蛋白的表現或活性的任何試劑。例如，PNPLA3特異性抑制劑包括能夠抑制PNPLA3 RNA和/或PNPLA3蛋白表現的核酸(包括反義化合物)、肽、抗體、小分子、以及其他試劑。

【0083】 術語「PNPLA3的抑制劑」、「PNPLA3抑制劑」和「PNPLA3表現抑制劑」在本文中可互換使用。抑制PNPLA3表現可用於藉由投與靶向PNPLA3的化合物，治療、預防、或緩解個體中與PNPLA3相關聯的疾病。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑可為PNPLA3特異性抑制劑。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑可為靶向PNPLA3的反義化合物、寡聚化合物、或寡核苷酸。在一些實施方式中，PNPLA3係反義寡核苷酸。在一些實施方式中，寡核苷酸係siRNA、靶

向寡核苷酸的微RNA或單鏈RNAi化合物，例如小髮夾RNA(shRNA)、單鏈siRNA (ssRNA) 和微RNA模擬物。

【0084】 在一些實施方式中，PNPLA3抑制劑係靶向PNPLA3核酸的反義寡核苷酸。在某些實施方式中，PNPLA3核酸具有藉由引用併入的美國專利案號10,774,333中列出的序列，例如RefSeq或GENBANK登錄號NM_025225.2；從核苷酸43921001至43,954,500截短的NC_000022.11 (SEQ ID NO: 2) ； AK123806.1 ； BQ686328.1 ； BF762711.1 ； DA290491.1 ；和美國專利案號10,774,333中作為「 SEQ ID No 7、8、9、和10 」列出的序列。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係反義寡核苷酸或寡聚化合物。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係單鏈的。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係雙鏈的。

【0085】 在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑包含長16個連接的核苷的修飾的寡核苷酸。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係反義化合物或寡聚化合物。

【0086】 在一些實施方式中，PNPLA3抑制劑係長12至30個連接的核苷的修飾的寡核苷酸，並且具有包含如藉由引用併入本文的美國專利案號10,774,333中所述之任何核鹼基序列的核鹼基序列，例如美國專利案號10,774,333的「 SEQ ID NO: 17-2169 」中的任一個。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係反義化合物或寡聚化合物。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係單鏈的。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係雙鏈的。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係長16至30個連接的核苷的修飾的寡核苷酸。

【0087】 在一些實施方式中，PNPLA3抑制劑包含修飾的寡核苷酸，其由如藉由引用併入本文的美國專利案號10,774,333中所發現的任何核鹼基序列組成，例如美國專利案號10,774,333的「 SEQ ID NO: 17-2169 」中的任一個。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係反義化合物或寡聚化合物。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係單鏈的。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係雙鏈的。

【0088】 在一些實施方式中，PNPLA3抑制劑包含修飾的寡核苷酸，其長12至30個連接的核苷，並且在如藉由引用併入本文的美國專利案號10,774,333中發現的核鹼基內互補，例如SEQ ID NO: 1的核鹼基5567-5642、5644-5731、5567-5731、5567-5620、13697-13733、20553-20676、20664-20824、20553-20824、和25844-25912，其中該修飾的寡核苷酸與SEQ ID NO: 1至少85%、至少90%、至少95%或100%互補。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係反義化合物或寡聚化合物。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係單鏈的。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係雙鏈的。在某些實施方式中，該修飾的寡核苷酸係長16至30個連接的核苷。

【0089】 在一些實施方式中，PNPLA3表現抑制劑係與編碼PNPLA3的核酸的區域互補的反義寡核苷酸。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑靶向PNPLA3核酸的核苷酸5567-5620。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑靶向具有SEQ ID NO: 1的核鹼基序列的PNPLA3核酸的核苷酸5567-5642、5644-5731、5567-5731、5567-5620中發現的核苷酸。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑與編碼PNPLA3的核酸序列（例如SEQ ID NO: 1）的5567-5731內的位點互補。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑與編碼PNPLA3的核酸序列（例如SEQ ID NO: 1）的5644-5731內的位點互補。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑與編碼PNPLA3的核酸序列（例如SEQ ID NO: 1）的5567-5642內的位點互補。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑與編碼PNPLA3的核酸序列（例如SEQ ID NO: 1）的5567-5620內的位點互補。在某些實施方式中，該等化合物係反義化合物、寡聚化合物、或寡核苷酸。在一些實施方式中，編碼PNPLA3的核酸係mRNA。

【0090】 在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑包含長12至30個連接的核苷的修飾的寡核苷酸。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑包含長16至30個連接的核苷的修飾的寡核苷酸。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑包含修飾的寡核苷

酸，該修飾的寡核苷酸長12至30個連接的核苷並且具有包含SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9、或10中任一個的至少8、9、10、11、12、13、14、15、或16個連續核鹼基部分的核鹼基序列。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑包含反義寡核苷酸，該反義寡核苷酸包含SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9、或10中任一個的至少8個連續核鹼基。在某些實施方式中，該修飾的寡核苷酸係長16至30個連接的核苷。

【0091】 在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑包含修飾的寡核苷酸，該修飾的寡核苷酸長12至30個連接的核苷並且具有包含SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9、和10中任一個的核鹼基序列。在某些實施方式中，該修飾的寡核苷酸係長16至30個連接的核苷。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑包含反義寡核苷酸，該反義寡核苷酸包含具有SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9、或10中任一個的至少8個、至少9個、至少10個、至少11個、至少12個、至少13個、至少14個、至少15個或至少16個連續鹼基的序列。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑包含反義寡核苷酸，該反義寡核苷酸包含具有SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9、或10中任一個的至少8個連續鹼基的序列。

【0092】 在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑包含反義寡核苷酸，該反義寡核苷酸包含SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9或10中的任一個。

【0093】 在某些實施方式中，靶向PNPLA3的PNPLA3抑制劑係藉由引用併入文中的美國專利案號10,774,333所述之ION 916333、975616、994284、975605、994282、975613、975617、975735、975736、或975612。

【0094】 在某些實施方式中，上述經修飾的寡核苷酸中任一種包含至少一種經修飾的核苷間鍵聯、至少一種經修飾的糖、和/或至少一種修飾的核鹼基。在某些實施方式中，上述修飾的寡核苷酸中任一種包含至少一種修飾的糖部分。在一些實施方式中，至少一種修飾的糖部分係2'-去氧基、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基

甲基、2'-O-甲氧基乙基、2'-氟、4'-CH(CH₃)-O-2'、4'-CH₂-O-2'、4'-(CH₂)₂-O-2'或其組合。在某些實施方式中，至少一種修飾的糖包括2'-去氧基、2'-O-甲氧基乙基。在某些實施方式中，至少一種修飾的糖係二環糖，如4'-CH(CH₃)-O-2'基團、4'-CH₂-O-2'基團、或4'-(CH₂)₂-O-2'基團。

【0095】 在某些實施方式中，任何前述修飾的寡核苷酸包含一或多個修飾的鹼基。在一些實施方式中，修飾的鹼基係5-甲基胞嘧啶。在一些實施方式中，1、2、3、4、5、6個或更多個胞嘧啶係5-甲基胞嘧啶。在一些實施方式中，反義寡核苷酸中的每個胞嘧啶均為5-甲基胞嘧啶。

【0096】 在某些實施方式中，該經修飾的寡核苷酸包括至少一種經修飾的核苷間鍵聯，如硫代磷酸酯核苷間鍵聯。在一些實施方式中，每個核苷間鍵聯係硫代磷酸酯鍵聯。

【0097】 在某些實施方式中，上述經修飾的寡核苷酸中的任一種包含：由連接的去氧核苷組成的缺口區段；由連接的核苷組成的5'翼（wing）區段；以及由連接的核苷組成的3'翼區段；其中該缺口區段位於該5'翼區段與該3'翼區段之間並且其中每個翼區段的每個核苷都包含經修飾的糖。在某些實施方式中，該修飾的寡核苷酸長12至30個連接的核苷，並且具有包含SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9、或10中任一項列舉的序列的核鹼基序列。在某些實施方式中，該修飾的寡核苷酸長16至30個連接的核苷，並且具有包含SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9、或10中任一項列舉的序列的核鹼基序列。在某些實施方式中，該修飾的寡核苷酸長16個連接的核苷，並且具有由SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9、或10中任一項列舉的序列組成的核鹼基序列。

【0098】 在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係反義寡核苷酸，其包含：

由十個連接的去氧核苷組成的缺口區段；

由三個連接的核苷組成的5'翼區段；以及

由三個連接的核苷組成的3'翼區段；

其中該缺口區段位於該5'翼區段與該3'翼區段之間，其中每個翼區段的每個核苷包含cEt糖；其中每個核苷間鍵聯均為硫代磷酸酯鍵聯並且其中每個胞嘧啶均為5-甲基胞嘧啶。

【0099】 在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係反義寡核苷酸，其由長12-30個連接的核鹼基的修飾的寡核苷酸組成並且具有包含SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9、或10中任一項列舉的序列的核鹼基序列，其中該修飾的寡核苷酸包含

由十個連接的去氧核苷組成的缺口區段；

由三個連接的核苷組成的5'翼區段；以及

由三個連接的核苷組成的3'翼區段；

其中該缺口區段位於該5'翼區段與該3'翼區段之間，其中每個翼區段的每個核苷包含cEt糖；其中每個核苷間鍵聯均為硫代磷酸酯鍵聯並且其中每個胞嘧啶均為5-甲基胞嘧啶。在某些實施方式中，該經修飾的寡核苷酸由16-30個連接的核苷組成。在某些實施方式中，該經修飾的寡核苷酸由16個連接的核苷組成。

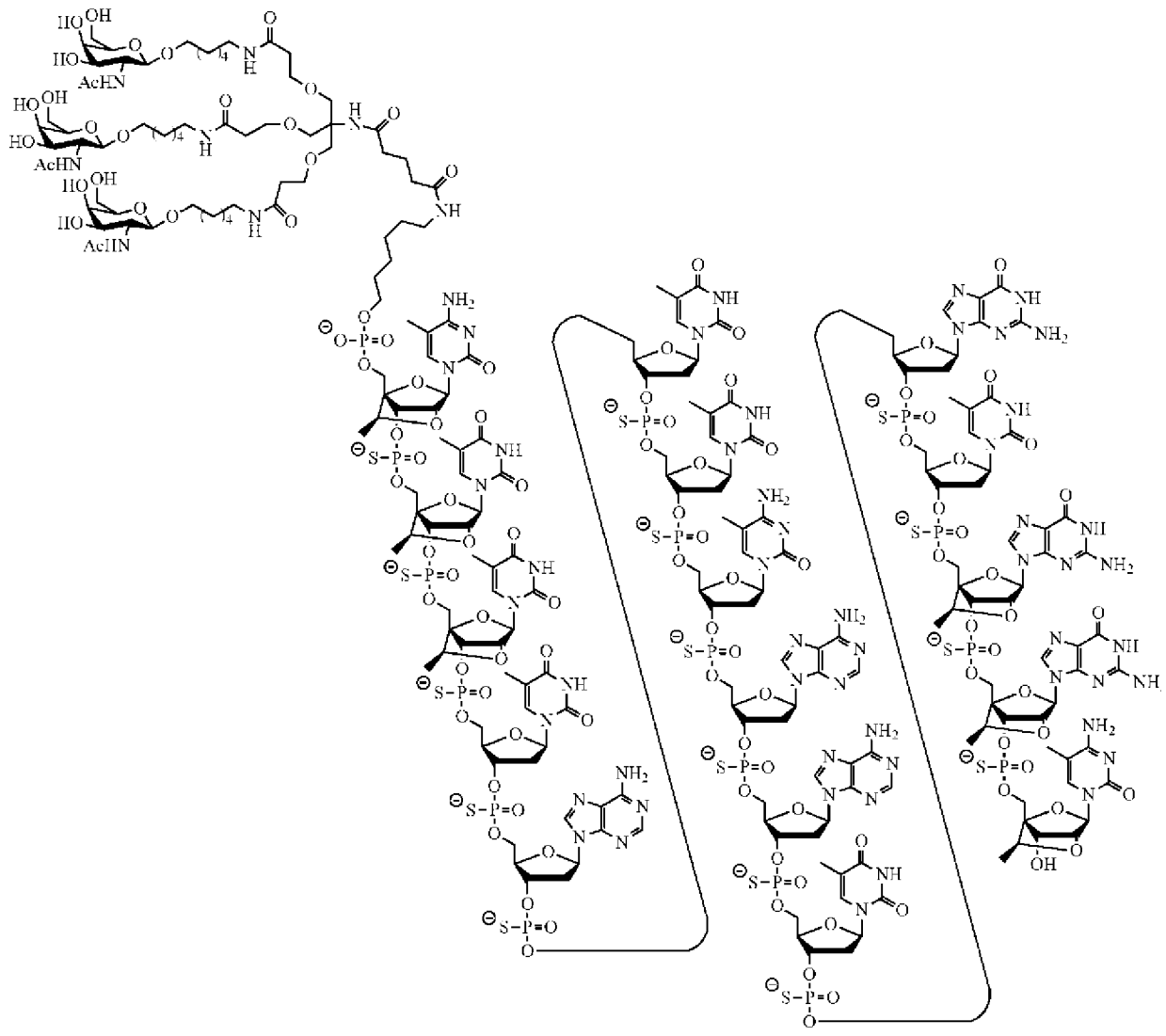
【0100】 在某些實施方式中，化合物包含修飾的寡核苷酸或由其組成，其中該修飾的寡核苷酸長16個連接的核苷並且由SEQ ID NO: 2的序列組成，其中該修飾的寡核苷酸包含：

由十個連接的去氧核苷組成的缺口區段；

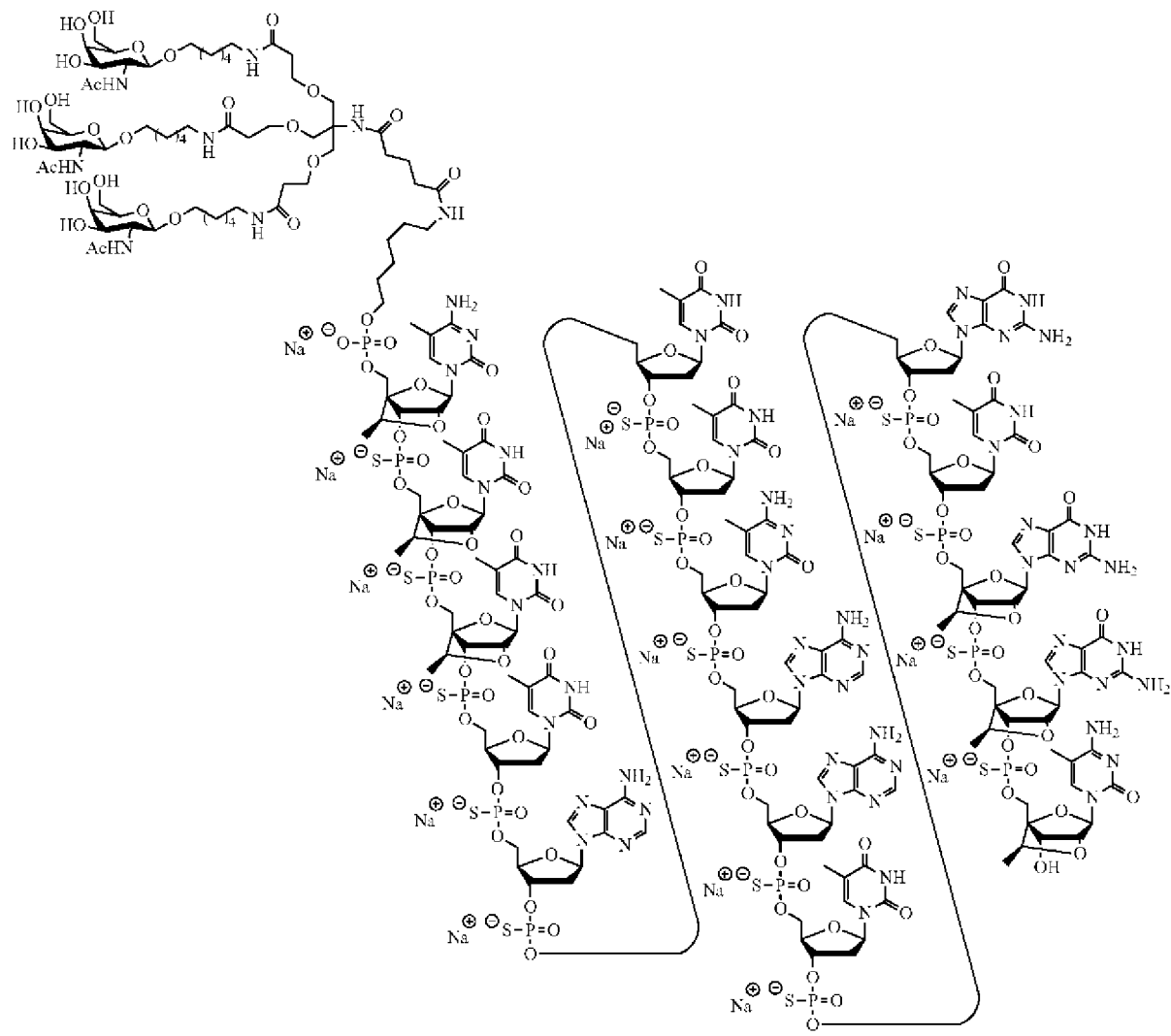
由三個連接的核苷組成的5'翼區段；以及

由三個連接的核苷組成的3'翼區段；

其中該缺口區段位於該5'翼區段與該3'翼區段之間，其中每個翼區段的每個核苷包含cEt糖；其中每個核苷間鍵聯均為硫代磷酸酯鍵聯；並且其中每個胞嘧啶均為5-甲基胞嘧啶。



【0103】 在一些實施方式中，PNPLA3表現抑制劑係下式化合物（SEQ ID NO: 2）：



【0104】 在上述實施方式的任一項中，PNPLA3抑制劑係反義寡核苷酸，其中反義寡核苷酸可以與編碼PNPLA3的核酸至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%互補。

【0105】 在上述實施方式的任一項中，PNPLA3抑制劑係反義寡核苷酸，其中反義寡核苷酸可為單鏈的。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑包含去氧核糖核苷酸。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係雙鏈的。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係雙鏈的並且包含核糖核苷酸。

【0106】 在上述實施方式的任一項中，PNPLA3抑制劑可為反義化合物或寡聚化合物。

【0107】 在上述實施方式的任一項中，PNPLA3抑制劑係反義寡核苷酸，其中反義寡核苷酸的長度可為8至80、10至30、12至50、13至30、13至50、14至30、14至50、15至30、15至50、16至30、16至50、17至30、17至50、18至22、18至24、18至30、18至50、19至22、19至30、19至50、或20至30個連接的核苷。在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係寡核苷酸。

【0108】 在某些實施方式中，PNPLA3抑制劑係反義寡核苷酸，其中反義寡核苷酸包含本文所述之修飾的寡核苷酸和軛合物基團。在某些實施方式中，該軛合物基團在該經修飾的寡核苷酸的5'末端連接至該經修飾的寡核苷酸。在某些實施方式中，該軛合物基團在該經修飾的寡核苷酸的3'末端連接至該經修飾的寡核苷酸。在某些實施方式中，該軛合物基團包括至少一個N-乙醯半乳糖（GalNAc）、至少兩個N-乙醯半乳糖（GalNAc）、或至少三個N-乙醯半乳糖（GalNAc）。

【0109】 在某些實施方式中，本文提供的PNPLA3抑制劑包含該經修飾的寡核苷酸之藥學上可接受的鹽。在某些實施方式中，該鹽係鈉鹽。在某些實施方式中，該鹽係鉀鹽。

【0110】 在某些實施方式中，文中描述的PNPLA3抑制劑由於具有小於2 μM 、小於1.5 μM 、小於1 μM 、小於0.9 μM 、小於0.8 μM 、小於0.7 μM 、小於0.6 μM 、小於0.5 μM 、小於0.4 μM 、小於0.3 μM 、小於0.2 μM 、小於0.1 μM 、小於0.05 μM 、小於0.04 μM 、小於0.03 μM 、小於0.02 μM 、或小於0.01 μM 的體外 IC_{50} 中的至少之一而是有活性的。

【0111】 在某些實施方式中，如本文描述的PNPLA3抑制劑係可高度耐受的，如藉由具有相對於對照動物丙胺酸轉胺酶（ALT）或天冬胺酸轉胺酶（AST）值不超過4倍、3倍、或2倍的增加，或與對照動物相比肝、脾、或腎重量不超過30%、20%、15%、12%、10%、5%、或2%的增加中至少一者所證明的。在某些

實施方式中，如本文描述的PNPLA3抑制劑係可高度耐受的，如藉由相對於對照動物ALT或AST沒有增加所證明的。在某些實施方式中，如本文描述的PNPLA3抑制劑係可高度耐受的，如藉由相對於對照動物肝、脾、或腎重量沒有增加所證明的。

【0112】 某些實施方式提供了組成物，該組成物包含前述提及的實施方式中任一項所述之PNPLA3抑制劑或其任一種藥學上可接受的鹽以及至少一種藥學上可接受的載體或稀釋劑。在某些實施方式中，該組成物具有小於約40厘泊（cP）、小於約30厘泊（cP）、小於約20厘泊（cP）、小於約15厘泊（cP）、或小於約10厘泊（cP）的黏度。在某些實施方式中，具有前述提及的黏度中任一種的組成物包含約100 mg/mL、約125 mg/mL、約150 mg/mL、約175 mg/mL、約200 mg/mL、約225 mg/mL、約250 mg/mL、約275 mg/mL、或約300 mg/mL濃度的本文提供的PNPLA3抑制劑。在某些實施方式中，具有任何前述黏度和/或PNPLA3抑制劑濃度的組成物具有室溫或約20°C、約21°C、約22°C、約23°C、約24°C、約25°C、約26°C、約27°C、約28°C、約29°C或約30°C的溫度。

GLP-1肽

【0113】 升糖素和升糖素樣肽-1（GLP-1）衍生自前升糖素原，該前升糖素原為具有158個胺基酸的先質多肽，其在不同的組織中被加工形成許多種不同的升糖素原衍生肽，包括升糖素、升糖素樣肽-1（GLP-1）、升糖素樣肽-2（GLP-2）和調酸催素（OXM），它們涉及許多種生理功能，包括葡萄糖平衡、胰島素分泌、胃排空、和腸道生長，以及調節進食。升糖素係具有相應於升糖素原的胺基酸33到61（前升糖素原的53到81）的29個胺基酸的肽，而GLP-1產生為具有相應於升糖素原的胺基酸72到108（前升糖素原的92到128）的37個胺基酸的肽。GLP-1(7-36)醯胺或GLP-1(7-37)酸係GLP-1的生物活性形式，其在GLP-1受體處顯示出基本上等同的活性。參見例如，藉由引用併入文中的US 9,765,130。

【0114】如在此使用的「GLP-1/升糖素促效劑肽」係嵌合肽，在測定1的條件下，其展現出相對於天然升糖素的至少約1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或更高的在升糖素受體上的活性，並且還展現出相對於天然GLP-1的至少約1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或更高的在GLP-1受體上的活性。

【0115】如在此使用的術語「天然升糖素」指的是天然存在的升糖素，例如，人升糖素，其包含SEQ ID NO: 11的序列。術語「天然GLP-1」係指天然存在的GLP-1，例如人GLP-1，並且是涵蓋例如GLP-1(7-36)醯胺（SEQ ID NO:12）、GLP-1(7-37)酸（SEQ ID NO:13）或者這兩種化合物的混合物的通用術語。如本文使用的，在沒有任何進一步指定的情況下，對「升糖素」或「GLP-1」的一般參考旨在分別表示天然的人升糖素或天然的人GLP-1。除非另外指出，「升糖素」係指人升糖素，並且「GLP-1」係指人GLP-1。

【0116】升糖素可藉由胰臟產生的並且可與升糖素受體（「GCGR」）相互作用。升糖素可在肝臟中起作用經由糖異生和糖原分解而升高血糖。當血糖開始下降時，升糖素可發信號給肝臟以便分解糖原和釋放葡萄糖，從而引起血糖水平朝向正常水平上升。GLP-1相比於升糖素可具有不同的生物活性。它可從腸L細胞分泌並且可結合到GLP-1受體上。GLP-1活性可包括刺激胰島素合成和分泌、抑制升糖素分泌、和抑制進食。

【0117】本文提供了升糖素受體或升糖素樣肽-1（GLP-1）的促效劑。在一些實施方式中，升糖素受體或升糖素樣肽-1（GLP-1）的促效劑包含多肽。結合到升糖素受體上且結合到GLP-1受體上的肽。在某些實施方式中，在此提供的肽係升糖素和GLP-1活性的共促效劑。此類肽在本文中稱為GLP-1/升糖素激動肽。如本文提供的GLP-1/升糖素激動肽具有有利比率的GLP-1和升糖素活性，以便促進體重減輕、預防體重增加、或者維持所希望的體重，並且具有優化的溶解度、

可配製性、和穩定性。在某些實施方式中，GLP-1/升糖素促效劑肽在此被提供為對人GLP1和人升糖素受體具有活性，在某些實施方式中相比於天然配體，對GLP-1受體的相對活性比對升糖素受體至少約高1倍、2倍、5倍、8倍、10倍、15倍、20倍或25倍。

【0118】如文中所用，術語「肽」涵蓋全長肽以及其片段、變體或衍生物，例如，GLP-1/升糖素激動肽（例如，在長度上為29、30或31個胺基酸）。如本文揭露的「肽」，例如GLP-1/升糖素激動肽，可為包含用來增加半衰期的另外的成分（例如像Fc結構域或白蛋白結構域）的融合多肽的一部分。如本文描述的肽還可以許多不同的途徑衍生。

【0119】當提及GLP-1/升糖素激動肽時，術語「片段」、「類似物」、「衍生物」或「變體」包括保留至少某種期望的活性（例如，結合到升糖素和/或GLP-1受體上）的任何肽。本文提供的GLP-1/升糖素激動肽的片段包括在表現、純化、和/或投與至受試者期間展現出所希望的特性的蛋白水解片段、缺失片段。

【0120】在某些實施方式中，GLP-1/升糖素促效劑肽被揭露為對升糖素和GLP-1受體具有所希望的效價，並且具有所希望的促進體重減輕的相對效價。在某些實施方式中，GLP-1/升糖素促效劑肽被揭露為在cAMP測定1（參見實例2）中展現出對GLP-1受體小於10,000 pM、小於5000 pM、小於2500 pM、小於1000 pM、小於900 pM、小於800 pM、小於700 pM、小於600 pM、小於500 pM、小於400 pM、小於300 pM、小於200 pM、小於100 pM、小於50 pM、小於25 pM、小於20 pM、小於15 pM、小於10 pM、小於5 pM、小於4 pM、小於3 pM、或小於2 pM的以EC50表示的體外效價。在某些實施方式中，GLP-1/升糖素促效劑肽被揭露為在4.4%人血清白蛋白中的cAMP測定(測定2,參見實例2)中展現出對GLP-1受體小於10,000 pM、小於5000 pM、小於2500 pM、小於1000 pM、小於900 pM、小於800 pM、小於700 pM、小於600 pM、小於500 pM、小於400 pM、小於300

pM、小於200 pM、小於100 pM、小於50 pM、小於25 pM、小於20 pM、小於15 pM、小於10 pM、小於5 pM、小於4 pM、小於3 pM、或小於2 pM的以EC50表示的體外效價。在某些實施方式中，GLP-1/升糖素促效劑肽被揭露為在cAMP測定1（參見藉由引用併入文中的美國專利案號9,765,130中的實例2）中展現出對升糖素受體小於10,000 pM、小於5000 pM、小於2500 pM、小於1000 pM、小於900 pM、小於800 pM、小於700 pM、小於600 pM、小於500 pM、小於400 pM、小於300 pM、小於200 pM、小於100 pM、小於50 pM、小於25 pM、小於20 pM、小於15 pM、小於10 pM、小於5 pM、小於4 pM、小於3 pM、或小於2 pM的以EC50表示的體外效價。在某些實施方式中，GLP-1/升糖素促效劑肽被揭露為在4.4%人血清白蛋白中的cAMP測定（測定2，參見藉由引用併入文中的美國專利案號9,765,130中的實例2）中展現出對升糖素受體小於10,000 pM、小於5000 pM、小於2500 pM、小於1000 pM、小於900 pM、小於800 pM、小於700 pM、小於600 pM、小於500 pM、小於400 pM、小於300 pM、小於200 pM、小於100 pM、小於50 pM、小於25 pM、小於20 pM、小於15 pM、小於10 pM、小於5 pM、小於4 pM、小於3 pM、或小於2 pM的以EC50表示的體外效價。在某些實施方式中，GLP-1/升糖素促效劑肽被揭露為當使用測定2時，當與天然配體比較時具有在約0.01到0.50範圍，例如，從約0.02到0.30，例如，約0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、0.28、或0.30的相對GLP1-R/GCGR效價比。

【0121】 在某些實施方式中，GLP-1/升糖素促效劑肽被揭露為在cAMP測定1（參見藉由引用併入文中的美國專利案號9,765,130中的實例2）中展現出對葡萄糖依賴性促胰島素肽（胃抑肽）（GIPR）小於10,000 pM、小於5000 pM、小於2500 pM、小於1000 pM、小於900 pM、小於800 pM、小於700 pM、小於600 pM、小於500 pM、小於400 pM、小於300 pM、小於200 pM、小於100 pM、小於

50 pM、小於25 pM、小於20 pM、小於15 pM、小於10 pM、小於5 pM、小於4 pM、小於3 pM、或小於2 pM的以EC50表示的體外效價。在某些實施方式中，GLP-1/升糖素促效劑肽被揭露為在4.4%人血清白蛋白中的cAMP測定（測定2，參見藉由引用併入文中的美國專利案號9,765,130中的實例2）中展現出對GIPR小於10,000 pM、小於5000 pM、小於2500 pM、小於1000 pM、小於900 pM、小於800 pM、小於700 pM、小於600 pM、小於500 pM、小於400 pM、小於300 pM、小於200 pM、小於100 pM、小於50 pM、小於25 pM、小於20 pM、小於15 pM、小於10 pM、小於5 pM、小於4 pM、小於3 pM、或小於2 pM的以EC50表示的體外效價。

【0122】 在某些實施方式中，在此提供的GLP-1/升糖素促效劑肽具有可接受的溶解度、可易於配製、血漿穩定性、和改進的藥物動力學特徵中的一或多個標準。在某些實施方式中，GLP-1/升糖素促效劑肽被揭露為可溶於在寬pH範圍的標準緩衝液中。

【0123】 在某些實施方式中，GLP-1/升糖素促效劑肽可以高達0.5 mg/ml、0.6 mg/ml、0.7 mg/ml、0.8 mg/ml、0.9 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、3 mg/ml、4 mg/ml、5 mg/ml、6 mg/ml、7 mg/ml、8 mg/ml、9 mg/ml、10 mg/ml或更高的濃度溶於通用緩衝溶液中，溶於緩衝系和例如從0.25到150 mM的一系列離子強度中，包括但不限於，磷酸鹽緩衝液、Tris緩衝液、羧胺酸鹽緩衝液、乙酸鹽緩衝液、琥珀酸鹽緩衝液、或組胺酸緩衝液。示例性的緩衝液包括100 mM羧胺酸鹽pH 4.5緩衝液、100 mM乙酸鹽pH 5緩衝液、100 mM琥珀酸鹽pH 5緩衝液、100 mM磷酸鹽pH 6緩衝液、100 mM組胺酸pH 6緩衝液、100 mM磷酸鹽pH 6.5緩衝液、100 mM磷酸鹽pH 7.0緩衝液、100 mM組胺酸pH 7.0緩衝液、100 mM磷酸鹽pH 7.5緩衝液、100 mM Tris pH 7.5緩衝液和100 mM Tris pH 8.0緩衝液。在某些實施方式中，GLP-1/升糖素促效劑肽被揭露為能以0.8 mg/ml溶於跨一系列pH範

圍，例如，從pH 4.0到pH 8.0，例如，在pH 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、或8.5的標準緩衝液中。在某些實施方式中，所公開的GLP-1/升糖素促效劑肽可溶於標準緩衝液中，該緩衝液的pH為從4.5至8.0、5.0至8.0、5.5至8.0、6.0至8.0、6.5至8.0、7.0至8.0、4.5至8.5、5.5至8.5、5.5至8.5、6.0至8.5、6.5至8.5或7.0至8.5。

【0124】 在某些實施方式中，GLP-1/升糖素促效劑肽被揭露為可在標準藥物配製物中配製。示例性配製物包括但不限於：0.1M Tris pH 7.5，150 mM 甘露醇，最終配製物pH = 7.2；0.05M Tris，50 mM精胺酸/脯胺酸，最終配製物pH = 8.0；或磷酸鈉緩衝液（pH 8）/1.85% W/V丙二醇，最終配製物pH = 7.0。在某些實施方式中，GLP-1/升糖素促效劑肽被揭露為以高達0.5 mg/ml、0.6 mg/ml、0.7 mg/ml、0.8 mg/ml、0.9 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、3 mg/ml、4 mg/ml、5 mg/ml、6 mg/ml、7 mg/ml、8 mg/ml、9 mg/ml、10 mg/ml或更高的濃度可溶於該等或其他配製物中。

【0125】 在某些實施方式中，GLP-1/升糖素促效劑肽被揭露為針對在血清或血漿中的蛋白酶係可接受地穩定的。升糖素或GLP-1的常見降解產物包括+1產物（酸）和DPP IV-裂解產物。具有+1品質的產物可能由麩醯胺酸的醯胺基團或C末端的脫醯胺作用產生，裂解產物由血漿中蛋白酶DPP IV的作用產生。在某些實施方式中，GLP-1/升糖素促效劑肽被揭露為在37° C下在血漿中24小時之後以高達30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或100%的水平在血漿中保持穩定。

【0126】 在此揭露了包含以下胺基酸序列的GLP-1/升糖素促效劑肽：

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X
28GX30

其中X2係G或S，X10係Y或K，X12係K、E、R或S，X13係K或Y，X15係D或E，X16係S或G，X17係E、R、Q或K，X18係R、S或A，X20係R、K或Q，X21係D或E，X23係V或I，X24係A或Q，X27係E或V，X28係A或K，並且X30係G或R（SEQ ID NO: 25）。在某些實施方式中，提供了以上所示的分離肽，其中X2係S，X10係Y或K，X12係K、E、R或S，X13係K或Y，X15係D，X16係S，X17係E、R、Q或K，X18係R、S或A，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E或V，X28係A，並且X30係G（SEQ ID NO:26）。在某些實施方式中，提供了以上所示的分離肽，其中X2係S，X10係Y或K，X12係K、E、R或S，X13係K或Y，X15係D，X16係S，如果X17係E則X18係R，或如果X17係R則X18係S，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E或V，X28係A，並且X30係G（分別為SEQ ID NO: 27和SEQ ID NO. 28）。

【0127】 在某些實施方式中，提供了以上所示的分離肽，其中X2係S，X10係Y，X12係K，X13係K，X15係D，X16係S，如果X17係E則X18係R，或如果X17係R則X18係S，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係V，X28係A，並且X30係G（分別為SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30）。在某些實施方式中，提供了以上所示的分離肽，其中X2係S，X10係K，如果X12係K、E或R且如果X12係K、E、R或S，X13係Y，X15係D，X16係S，如果X17係E則X18係R，以及如果X17係R則X18係S，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G（分別為SEQ ID NO: 31和SEQ ID NO: 32）。在某些實施方式中，提供了以上所示的分離肽，其中X2係S，X10係K，X12係E，X13係Y，X15係D，X16係S，如果X17係E則X18係R，或如果X17係R則X18係S，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G（分別為SEQ ID NO: 33和SEQ ID NO: 34）。在某些實施方式中，提供了以上所示的分離肽，其中X2係S，X10係K，X12係R，X13係Y，X15係D，X16係S，如果X17係E則X18係R，

或如果X17係R則X18係S，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G（分別為SEQ ID NO: 35和SEQ ID NO: 36）。

【0128】 本文提供的GLP-1/升糖素促效劑肽可以包括但不限於G730（SEQ ID NO: 14）、G797（SEQ ID NO: 15）、G849（SEQ ID NO: 16）、G933（SEQ ID NO: 17）、G865（SEQ ID NO: 18）、G796（SEQ ID NO: 19）、G812（SEQ ID NO: 20）和G380（SEQ ID NO: 21）。該等GLP-1/升糖素促效劑肽列在表1中：

[表1]

GLP-1/升糖素肽序列		
肽	序列	SEQ ID NO
G730	HSQGT FTSDY SKXD SERAR DFVAW LVAGG-醯胺 X13 = K(gE-palm)	14
G797	HSQGT FTSDX SEYLD SERAR DFVAW LEAGG-醯胺 X10 = K(gE-palm)	15
G849	HSQGT FTSDX SRYLD SRSAR DFVAW LEAGG-醯胺 X10 = K(gE-palm)	16
G933	HSQGT FTSDX SEYLD SERAR DFVAW LEAGG-酸 X10 = K(gE-palm)	17
G865	HSQGT FTSDX SSYLD SRSAR DFVAW LEAGG-醯胺 X10 = K(gE-palm)	18
G796	HSQGT FTSDX SSYLD SRRAR DFVAW LEAGG-醯胺 X10 = K(gE-palm)	19

G812	HSQGT FTSDX SKYLE GQAAK EFIAW LEKGR-醯胺 X10 = K(gE-palm)	20
G380	HGQGT FTSDY SKYLD SXRAQ DFVQW LVAGG-醯胺 X17 = K(gE-palm)	21
G931	HSQGT FTSDY SKXLD SERAR DFVAW LVAGG-酸 X13 - K (gE-palm)	22
G934	HSQGT FTSDX SKYLE GQAAK EFIAW LEKGR-酸 X10 - K (gE-palm)	23
G973	HSQGT FTSDX SSYLD SRSAR DFVAW LEAGG-酸 X10 - K (gE-palm)	24
GLP-1 (7-36醯 胺)	HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EFIAW LVKGR	12
GLP-1 (7-37 酸)	HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EFIAW LVKGRG	13
升糖素	HSQGT FTSDY SKYLD SRRAQ DFVQW LMNT	11

i. 製備針對升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑的方法

【0129】 GLP-1/升糖素促效劑肽。本文提供的GLP-1/升糖素促效劑肽可藉由任何合適的方法製備，例如US 9,765,130中所述之方法，其藉由引用併入本文。例如，在某些實施方式中，藉由熟悉該項技術者熟知之方法，例如藉由如Merrifield描述的固相合成（1963，*J. Am. Chem. Soc.*[美國化學學會雜誌] 85:2149-

2154)，化學合成在此提供的GLP-1/升糖素促效劑肽。可以例如，藉由使用自動合成儀，使用標準試劑完成固相肽合成。

【0130】可替代地，可以使用如熟悉該項技術者熟知的合宜的載體/宿主細胞組合以重組方式產生在此提供的GLP-1/升糖素促效劑肽。用於以重組方式產生GLP-1/升糖素激動肽的許多種方法係可得的。通常，將編碼GLP-1/升糖素激動肽的多核苷酸序列插入適當的表現媒介物，例如，含有用於該插入的編碼序列的轉錄和翻譯的必需元件的載體。將編碼GLP-1/升糖素激動肽的核酸插入載體的正確閱讀框中。然後將該表現載體轉染到適合的表現該GLP-1/升糖素激動肽的宿主細胞中。適合的宿主細胞包括但不限於細菌、酵母、或哺乳動物細胞。許多種可商購的宿主-表現載體系統可以用來表現本文描述的GLP-1/升糖素激動肽。

ii. 修飾、軀合、融合和衍生。

【0131】在一些實施方式中，本文所述之肽包含對胺基酸序列中胺基酸的修飾。在某些實施方式中，在此提供的GLP-1/升糖素促效劑肽經由胺基酸修飾而被穩定化。在某些實施方式中，C末端胺基酸的羧基被醯胺化。在某些實施方案中，C末端胺基酸係醯胺化甘胺酸，例如G730、G797、G849、G865、G796、G812和G380。在某些實施方式中，例如，G933，該C末端甘胺酸係未修飾的酸。在某些實施方式中，GLP-1/升糖素促效劑肽被提供為其中一或多個胺基酸殘基被醯化，即添加醯基部分。例如，在某些實施方式中，在此提供的GLP-1/升糖素促效劑肽含有一或多個離胺酸殘基，其中棕櫚醯部分被附接到N(ε)基團上。在某些實施方式中，連接基結合在離胺酸與該棕櫚醯基團之間。這個連接基可為γ羧胺酸基團，或為替代連接基，例如但不限於，β丙胺酸和胺基己酸。可以使用不同的醯化方法，如添加膽固醇基或肉豆蔻醯基。在某些實施方式中，該棕櫚醯部分被添加在位置13（例如，G730）。在某些實施方式中，該棕櫚醯部分被添加在位置

10（例如，G797、G849、G933、G865、G796、和G812）。在某些實施方式中，該棕櫚醯部分被添加在位置17（例如，G380）。

【0132】 在此提供的GLP-1/升糖素促效劑肽，例如，G730、G797、G849和G933可以被棕櫚醯化，以便借助於與血清白蛋白結合而延長它們的半衰期，由此降低它們的腎臟清除傾向，如藉由引用併入本文的US 9,765,130的實例1中所述。

【0133】 可替代地或另外，本文揭露的GLP-1/升糖素激動肽可與異源部分結合，例如以延長半衰期。該異源部分係蛋白質、肽、蛋白質結構域、連接基、有機聚合物、無機聚合物、聚乙二醇（PEG）、生物素、白蛋白、人血清白蛋白（HSA）、HSA FcRn結合部分、抗體、抗體的結構域、抗體片段、單鏈抗體、結構域抗體、白蛋白結合結構域、酶、配體、受體、結合肽、非FnIII支架、表位標籤（epitope tag）、重組多肽聚合物、細胞介素、或此類部分的兩種或更多種的組合。

【0134】 例如，GLP-1/升糖素促效劑肽可與異源多肽融合。藉由重組基因融合和表現或藉由化學軛合，該等肽可融合到蛋白質上。適合於作為用於融合的伴侶的蛋白質包括但不限於，人血清白蛋白、抗體和包含到抗體的Fc部分上的融合的抗體片段。GLP-1已經與該等蛋白質融合，並保留了效力（L. Baggio等人, Diabetes[糖尿病] 53 2492-2500 (2004)；P. Barrington等人 Diabetes, Obesity and Metabolism[糖尿病，肥胖和代謝] 13 426-433 (2011)；P. Paulik等人 American Diabetes Association[美國糖尿病學會] 2012, 海報1946）。還已描述了延伸的重組肽序列以給出高分子量肽（V. Schellenberger等人, *Nature Biotechnol*[自然生物技術]27 1186-1190 (2009)；PASylation (EP2173890)）。在某些實施方式中，GLP-1/升糖素促效劑肽與C末端的融合伴侶（例如白蛋白或Fc部分）結合為融合蛋白的N末端部分。如在此所述之GLP-1/升糖素促效劑肽還可被融合到肽或蛋白質結

構域上，例如對於人血清白蛋白具有親和力的「Albudabs」（M.S. Dennis等人，*J Biol Chem*[生物化學雜誌]277 35035-35043（2002）；A. Walker等人，*Protein Eng Design Selection*[蛋白質工程、設計與選擇]23 271-278（2010））。用於將在此揭露的GLP-1/升糖素促效劑肽與異源多肽例如白蛋白或Fc部分融合的方法係熟悉該項技術者已知的。

【0135】其他異源部分可以輻合到GLP-1/升糖素促效劑肽上以進一步穩定或增加半衰期。為了化學融合，某些實施方式的特徵為維持自由N末端，但是可以產生用於衍生的可替代點。另一種替代方法係用大的化學部分，例如高分子量聚乙二醇（PEG），來衍生這種肽。「聚乙二醇化GLP-1/升糖素促效劑肽」具有共價結合到其上的PEG鏈。GLP-1/升糖素促效劑肽的衍生，例如，聚乙二醇化，可以在經棕櫚醯化的離胺酸上進行，或者替代地在被取代或藉由延伸而被結合的殘基（如半胱胺酸）上進行，以允許衍生。可以針對相對效價和在GLP-1受體與升糖素受體活化之間的平衡將以上GLP-1/升糖素促效劑肽形式進行體外和/或體內表徵。

【0136】通用術語「聚乙二醇鏈」或「PEG鏈」指的是以通式 $H(OCH_2CH_2)_nOH$ 表示的處於支鏈或直鏈形式的氧化乙烯和水的縮合聚合物的混合物，其中n係3、4、5、6、7、8、9或更大的整數。PEG鏈包括乙二醇的聚合物，具有選自大約500到大約40,000道爾頓範圍的平均總分子量。PEG鏈的平均分子量以數位指示，例如，PEG-5,000指的是具有平均大約5,000的總分子量的聚乙二醇鏈。

【0137】可以藉由本領域已知的任何聚乙二醇化反應來進行聚乙二醇化。參見，例如，*Focus on Growth Factors*[聚焦生長因子]，3: 4-10，1992和歐洲專利申請EP 0 154 316和EP 0 401 384。可以通過使用反應性聚乙二醇分子（或類似的反應性水溶性聚合物）的醯化反應或烷基化反應進行聚乙二醇化。

【0138】 用於製備聚乙二醇化的GLP-1/升糖素促效劑肽的方法通常包括以下步驟：(a) 在分子藉此附接到一或多個PEG基團的條件下，使GLP-1/升糖素促效劑肽與聚乙二醇（如PEG的反應性酯或醛衍生物）反應，和(b) 獲得一或多種反應產物。

投與

【0139】 本揭露提供了藉由向受試者投與PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑來治療受試者的肝病之方法。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑與升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑同時投與。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑彼此間隔不到1小時投與。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑彼此間隔不到24小時投與。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑彼此間隔不到72小時投與。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑彼此間隔不到一週投與。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑彼此間隔不到兩週投與。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑彼此間隔不到一個月、彼此間隔不到2個月、或彼此間隔不到3個月或更長時間投與。

【0140】 各種投與模式係熟悉該項技術者已知的，並且可用於投與PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑。例如，投與方式可包括口服、腸胃外、吸入或局部投與。「胃腸外投與」可意指通過注射或輸注投與。胃腸外投與可包括皮下投與、靜脈內投與、肌內投與、動脈內投與、腹膜內投與、或顱內投與（例如鞘內或腦室內、陰道或直腸投與）。用於投與的形式的另一個實例係注射用溶液，特別是用於靜脈內或動脈內注射或滴注的溶液。在此提供的PNPLA3表現抑制劑和/或GLP-1/升糖素促效劑肽可以作為單劑量或作為多劑量

投與。在某些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑和/或GLP-1/升糖素促效劑肽藉由皮下注射投與。

【0141】 在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑藉由相同的投與方式投與。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑藉由不同的投與方式投與。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑經腸胃外投與。在一些實施方式中，將升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑經腸胃外投與。

【0142】 胃腸外配製物可為單次推注劑量，輸注或載入推注劑量，隨後是維持劑量。可以具體固定的或可變的間隔給予該等組成物，例如，每日一次，或以「在需要時」為基礎。也可以調整劑量方案以便提供最佳期望反應（例如治療性或預防性反應）。

【0143】 PNPLA3表現抑制劑和/或升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑的給藥頻率可由熟悉該項技術者確定而無需過度實驗。在一些實施方式中，PNPLA3表現抑制劑的給藥頻率與升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑的給藥頻率相同。在一些實施方式中，PNPLA3表現抑制劑的給藥頻率不同於升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑的給藥頻率，例如更頻繁或更不頻繁。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑每天投與、每天投與兩次或每天投與三次。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑每週投與、每週投與兩次或每週投與三次。在一些實施方式中，將PNPLA3表現抑制劑每月投與、每月投與兩次或每月投與三次。在一些實施方式中，投與PNPLA3表現抑制劑不超過每週一次、每兩週一次、每三週一次、每4週一次、每五週一次、每六週一次或每7週一次。在一些實施方式中，將升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑每天投與、每天投與兩次或每天投與三次。在一些實施方式中，將升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑每週投與、每週投與兩次或每週投與三次。在一些實施方式中，將升糖素受體和/或GLP-1受體促

效劑每月投與、每月投與兩次或每月投與三次。在一些實施方式中，投與升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑不超過每週一次、每兩週一次、每三週一次、每4週一次、每五週一次、每六週一次或每7週一次。

適應症

【0144】 本文所述之方法、化合物、肽和組成物可用於治療受試者的肝病。術語「受試者」係指需要用本文提供的PNPLA3表現抑制劑和GLP-1/升糖素促效劑肽的組合治療的任何受試者，特別是哺乳動物受試者。哺乳動物受試者包括，但不限於，人、狗、貓、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、馬、牛、熊、母牛、猿類、猴子、猩猩和黑猩猩等。在一個實施方式中，該受試者係人類受試者。在一些實施方式中，受試者係女性受試者。在一個實施方式中，受試者係男性受試者。

【0145】 如本文所用，「有需要的受試者」係指需要治療的個體，例如患有肝病的受試者。在一些實施方式中，本揭露提供治療肝病例如NASH和/或NAFLD之方法。非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）可包括從脂肪變性到非酒精性脂肪性肝炎（NASH）和肝硬化的一系列肝病。NAFLD可被定義為在肝臟中脂肪積聚超過按重量計5%、缺乏顯著的酒精消耗、脂肪生成藥物治療或遺傳性障礙（參見例如，Kotronen等人, *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* [動脈粥樣硬化、血栓形成和血管生物學] 2008, 28: 27-38）。

【0146】 非酒精性脂肪性肝炎（NASH）可為具有炎症和肝損傷跡象的NAFLD。在一些實施方式中，NASH可在組織學上藉由大泡性脂肪變性、肝細胞氣球樣變性和小葉炎性浸潤來定義（Sanyal, *Hepatol. Res.* [肝臟病學研究] 2011, 41: 670-4）。一些研究估計NASH影響2-3%的普通人群。在存在其他病變的情況下，如肥胖或糖尿病，一些研究已報導估計的患病率分別增加至7%和62%（參見例如，Hashimoto等人, *J. Gastroenterol.* [胃腸病學雜誌] 2011, 46(1): 63-69）。

【0147】 在一些實施方式中，本文提供的方法適用於治療肝病、NAFLD、肝性脂肪變性、非酒精性脂肪性肝炎（NASH）、肝硬化、肝細胞癌、酒精性肝病、酒精性脂肪性肝炎（ASH）、HCV肝炎、慢性肝炎、遺傳性血色素沈著症、或原發性硬化性膽管炎。本文提供的某些實施方式涉及降低動物中肝損傷、脂肪變性、肝纖維化、肝臟炎症、肝癭痕化或硬化、肝功能衰竭、肝腫大、轉胺酶升高、或肝臟脂肪堆積的化合物和組成物。

【0148】 在一些實施方式中，受試者可具有次要適應症，例如，肥胖受試者或希望促進體重或體脂肪減少、體重或體脂肪維持、或在規定時間段預防體重增加或將其降低到最低限度的有肥胖症傾向的受試者。在一些實施方式中，肝病係非酒精性脂肪肝病（NAFLD）。在一些實施方式中，肝病係非酒精性脂肪性肝炎。在一些實施方式中，肝病係肝纖維化。

【0149】 在一些實施方式中，本揭露提供了一種減少患有肝病的受試者的肝臟中的脂肪變性之方法，其包括向該受試者投與：i) 含patatin樣磷脂酶域3（PNPLA3）表現抑制劑；和ii) 升糖素受體和/或升糖素樣肽-1（GLP-1）受體促效劑。在一些實施方式中，與單獨投與PNPLA3表現抑制劑或升糖素受體GLP-1受體促效劑時的總肝臟脂肪變性相比，受試者中的總肝臟脂肪變性降低。在一些實施方式中，與單獨投與PNPLA3表現抑制劑或升糖素受體GLP-1受體促效劑時的總肝臟脂肪變性相比，受試者中的總肝臟脂肪變性降低至少30%。在一些實施方式中，與單獨投與PNPLA3表現抑制劑或升糖素受體GLP-1受體促效劑時的總肝臟脂肪變性相比，受試者中的總肝臟脂肪變性降低至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%或至少60%。

【0150】 在一些實施方式中，與單獨投與PNPLA3表現抑制劑或升糖素受體GLP-1受體促效劑時的總肝臟脂肪變性相比，受試者中的總肝臟脂肪變性降低至少30%。在一些實施方式中，與單獨投與PNPLA3表現抑制劑或升糖素受體

GLP-1受體促效劑時的總肝臟脂肪變性相比，受試者中的總肝臟脂肪變性降低至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%或至少60%。

【0151】 在一些實施方式中，本揭露提供了一種減少患有非酒精性脂肪肝病的受試者的肝臟中的炎症之方法，其包括向該受試者投與：i) 含patatin樣磷脂酶域3 (PNPLA3) 表現抑制劑；和ii) 升糖素受體和/或升糖素樣肽-1 (GLP-1) 受體促效劑。在一些實施方式中，與單獨投與PNPLA3表現抑制劑或升糖素受體GLP-1受體促效劑時的肝臟炎症相比，受試者中的肝臟炎症減少至少50%。在一些實施方式中，與單獨投與PNPLA3表現抑制劑或升糖素受體GLP-1受體促效劑時的肝臟炎症相比，受試者中的肝臟炎症減少至少55%、至少60%、至少65%、至少70%或至少75%。

【0152】 在一些實施方式中，減少患有肝病的受試者中的肝膠原的方法包括向該受試者投與：i) 含patatin樣磷脂酶域3 (PNPLA3) 表現抑制劑；和ii) 升糖素受體和/或升糖素樣肽-1 (GLP-1) 受體促效劑。在一些實施方式中，與單獨投與PNPLA3表現抑制劑或升糖素受體GLP-1受體促效劑時的肝膠原相比，受試者中的肝膠原減少至少25%。在一些實施方式中，與單獨投與PNPLA3表現抑制劑或升糖素受體GLP-1受體促效劑時的肝膠原相比，受試者中的肝膠原減少至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、或至少50%。

藥物配製物

【0153】 在一些實施方式中，本揭露提供了藥學上可接受的組成物，其包含含patatin樣磷脂酶域3 (PNPLA3) 表現抑制劑和升糖素受體和/或升糖素樣肽-1 (GLP-1) 受體促效劑以及至少一種藥學上可接受的賦形劑。

【0154】 術語「組成物」或「藥物組成物」係指包含本文提供的PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑以及例如藥學上可接受的載體、

賦形劑或稀釋劑的組成物，其用於投與給需要治療的受試者，例如患有肝病的人類受試者。

【0155】 術語「藥學上可接受的」係指如下組成物，該等組成物在合理的醫學判斷範圍內適合於與人以及動物的組織接觸而沒有過度的毒性或與合理的利益/風險比相當的其他併發症。「藥物組成物」或「藥物配製物」可包括適於向個體投與的物質的混合物。例如，藥物組成物可以包括一或多種化合物或其鹽和無菌水溶液。在一些實施方式中，藥物配製物包含藥學上可接受的載體或稀釋劑。「藥學上可接受的載體或稀釋劑」意指適合於在投與個體中使用的任何物質。例如，藥學上可接受的載體可為無菌水溶液，如PBS或注射用水。

【0156】 在一些實施方式中，藥物配製物包含藥學上可接受的鹽。「藥學上可接受的鹽」意指化合物（如寡聚化合物或寡核苷酸）的生理學和藥學上可接受的鹽，即保留母體化合物的所希望的生物學活性並且不對其賦予不希望的毒理學效應的鹽。

【0157】 還提供了組成物，例如藥物組成物，其含有有效量的本文提供的PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑，被配製用於治療代謝疾病，例如肝病。「有效量」係本文提供的PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑的量，其以單劑量或作為一系列劑量的一部分向受試者投與對於治療（例如治療肝病）係有效的。這個量可為對於所有被治療的受試者而言的固定劑量，或者可以取決於被治療的受試者的重量、健康、和身體狀況、所希望的體重減輕或體重維持的程度、肽的配製、醫療狀況的專業評估、以及其他相關因素而改變。

【0158】 可以根據已知的方法配製本揭露之組成物。適合的製備方法描述於，例如，Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明頓藥物科學]，第19版，A.R. Gennaro編著，馬克出版公司（Mack Publishing Co.），賓夕法尼亞州伊斯頓市

(Easton, PA) (1995), 將其藉由引用以其全文結合在此。組成物可以處於多種形式, 包括但不限於, 水溶液、乳劑、凝膠劑、混懸劑、凍乾形式或本領域已知的任何其他形式。另外, 該組成物可含有藥學上可接受的添加劑, 包括例如, 稀釋劑、黏合劑、穩定劑和防腐劑。一旦配製, 本揭露之組成物即可以直接投與給受試者。

【0159】 可以與本揭露之組成物一起使用的載體係本領域熟知的, 並且包括但不限於, 例如甲狀腺球蛋白、白蛋白(如人血清白蛋白)、破傷風類毒素、和聚胺基酸(如聚L-離胺酸、聚L-麩胺酸)、流感病毒和乙肝病毒核心蛋白, 等等。可以使用許多種水性載體, 例如, 水、緩衝水、0.8%鹽水、0.3%甘胺酸、透明質酸等等。可以藉由常規的、熟知的滅菌技術將組成物滅菌, 或者可以將其過濾滅菌。可將得到的組成物包裝為原樣使用、或凍乾, 該凍乾製劑在給藥之前與無菌溶液組合。根據需要, 組成物可以含有藥學上可接受的輔助物質以接近生理條件, 例如pH調節和緩衝劑、張力調節劑、濕潤劑等, 例如乙酸钠、乳酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、失水山梨醇單月桂酸酯、油酸三乙醇胺等。在一些實施方式中, 組成物被配製用於腸胃外投與。

【0160】 在一些實施方式中, 本揭露提供了套組, 其包含: i) PNPLA3表現抑制劑; 和ii) 升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑。在一些實施方式中, PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP受體促效劑在套組中處於同一劑型中。在一些實施方式中, PNPLA3表現抑制劑和升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑在套組中處於不同劑型中。

【0161】 本文引用的所有參考文獻, 包括專利、專利申請、論文、教科書等以及其中引用的參考文獻(如同它們還未曾引用過的程度)藉由引用以其全文併入本文。

實例

實例1-組合的PNPLA3緘默抑制和基於腸促胰島素的療法GLP-1和升糖素受體雙重促效劑對改善非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）、非酒精性脂肪性肝炎（NASH）和肝纖維化具有優異的功效

介紹

【0162】 非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）及其更晚期的致病形式非酒精性脂肪性肝炎（NASH）係影響龐大且日益增長的人群的未滿足的醫學需求（Younossi等人 Nat Rev Gastroenterol Hepatol[自然評論:胃腸病學與肝臟病學], 2018, DOI: 10.1038/nrgastro.2017.109）。NAFLD被定義為由酒精攝入以外的原因誘導的過量肝臟脂肪堆積（脂肪肝），並且包括NAFL和NASH、纖維化和肝硬化。脂肪肝在不同比例的個體中進展為脂肪性肝炎、NASH，伴有或不伴有纖維化，最終導致易感個體中的肝硬化、肝衰竭和肝細胞癌（Friedman等人 Nat Med[自然醫學], 2018, DOI: 10.1038/s41591-018-0104-9）。

【0163】 NAFLD和NASH具有強遺傳成分。與該等病症相關的最常見突變係含patatin樣磷脂酶域3（*PNPLA3*）基因的rs738409變體（148M）（Carlsson等人 Aliment Pharmacol Ther[消化藥理學和治療學], 2020, DOI: 10.1111/apt.15738）。肝臟中的Pnpla3緘默改善了小鼠模型中的NAFLD、NASH和相關的肝纖維化，該小鼠模型經基因工程化以在小鼠*Pnpla3*基因中攜帶人風險對偶基因變體（148M）（Lindén等人 Mol Metab[分子代謝], 2019, DOI: 10.1016/j.molmet.2019.01.013）。

【0164】 肥胖和2型糖尿病（T2DM）係發生NAFLD和NASH的主要風險因素，並且已經顯示用減輕體重和改善葡萄糖平衡的腸促胰島素激素治療改善NAFLD和NASH。此類腸促胰島素激素包括接合升糖素樣肽-1（GLP-1）受體、GLP-1和升糖素受體、或GLP-1和胃抑制多肽（GIP）受體的肽類似物（Newsome等人 NEJM[新英格蘭醫學雜誌], 2020, DOI: 10.1056/NEJMoa2028395；Ambry等人 Lancet[柳葉刀], 2018, DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30726-8；Boland等人 Nat

Metab[自然代謝], 2020, DOI: 10.1038/s42255-020-0209-6 + Hartman等人 Diabetes Care[糖尿病護理], 2020, DOI: 10.2337/dc19-1892 ; Kannt等人 Diabetes Obes Metab[糖尿病肥胖與代謝], 2020, DOI: 10.1111/dom.14035) 。

【0165】 假設用PNPLA3緘默抑制和腸促胰島素激素受體激活的組合治療對NAFLD、NASH和肝纖維化的治療具有累加的有益效果。為了探索這一點，使用人PNPLA3 I148M NASH風險對偶基因的基因工程小鼠模型，同時餵食誘導NASH的飲食。然後用以下治療該等小鼠；1) 對照反義寡核苷酸(ASO)；2) Pnpla3 ASO；3) 可妥度肽，平衡的GLP-1受體和升糖素受體雙重促效劑肽；或4) Pnpla3 ASO和可妥度肽的組合。

【0166】 該研究首次證明，藉由將PNPLA3 ASO緘默抑制治療與腸促胰島素模擬物治療（以可妥度肽為例）組合，對NAFLD、NASH和肝纖維化實現了令人驚訝的優異有益治療效果。與各自單獨的治療相比，藉由組合治療獲得的結果顯示出協同效應。

材料和方法

鼠Pnpla3 cEt 5'-GalNAc₃-軛合的cEt ASO和可妥度肽

【0167】 使用靶向小鼠Pnpla3基因（5'-TATTTTGGTGTATCC-3'）（SEQ ID NO: 37）的最佳有效小鼠S-受約束的乙基（cEt）-修飾的16聚體ASO（Lindén等人 Mol Metab[分子代謝], 2019, DOI: 10.1016/j.molmet.2019.01.013）。該小鼠Pnpla3 ASO藉由與三觸角型N-乙醯半乳糖（GalNAc₃）的5'-軛合修飾，以進一步增強皮下投與後體內肝細胞靶向。使用化學匹配的混雜對照GalNAc₃軛合的ASO（5'-GGCCAATACGCCGTCA-3'）（SEQ ID NO: 38）證明了靶標敲低的特異性。可妥度肽（MEDI0382）被工程化以平衡GLP-1受體和升糖素受體激動作用（對GLP-1受體親和力具有約5:1偏差）（Henderson等人 Diabetes Obes Metab[糖尿病肥胖與代謝], 2016, DOI: 10.1111/dom.12735）。

動物

【0168】 所有動物實驗均為在人道關懷下進行的，並得到瑞典哥德堡實驗動物倫理委員會的批准。飼養機構已獲得實驗動物護理評估和認證協會（AAALAC）的全面認可。藉由使用如前所述之同源重組，將小鼠*Pnpla3*基因第148位胺基酸中的異白胺酸密碼子替換為甲硫胺酸密碼子，將人*PNPLA3* I148M突變引入小鼠*Pnpla3*基因中（Lindén等人 Mol Metab[分子代謝], 2019, DOI: 10.1016/j.molmet.2019.01.013）。將雜合*Pnpla3*^{148I/M}小鼠雜交以產生實驗純合*Pnpla3*^{148M/M}敲入小鼠用於藥理學研究。在研究開始前使用PCR驗證所有實驗動物具有正確的基因型，並在終止後使用PCR再次驗證，如前所述（Lindén等人 Mol Metab[分子代謝], 2019, DOI: 10.1016/j.molmet.2019.01.013）。將所有動物安置在具有白楊木片墊料和築巢材料的透明模選殖籠中，並控制飼養設施的溫度（21 ± 1°C）和濕度（50 ± 10%）。小鼠自由獲取自來水和食物，並且處於12小時晝/夜週期。

【0169】 給雄性*Pnpla3*^{148M/M}小鼠（6-8週齡）餵食高脂肪（40 kcal%脂肪（非反式脂肪Primex Shortening）、果糖（20 kcal%）和膽固醇（2%）飲食（NASH飲食；D16022301，研究飲食公司（Research Diets），新布朗斯維克市，新澤西州），持續22週。然後基於體重將小鼠分配到研究組，餵食相同的NASH飲食，並給予1) 對照ASO + 鹽水，2) *Pnpla3* ASO + 鹽水，3) 對照ASO + 可妥度肽，或4) *Pnpla3* ASO + 可妥度肽，持續14週。ASO以5 mg/kg/周給藥，每週兩次皮下注射投與，鹽水作為媒介物。可妥度肽以1 nmol/kg給藥，每天皮下注射投與，鹽水作為媒介物。未接受可妥度肽治療的小鼠每天注射媒介物（鹽水），使得所有動物接受相同數量的皮下注射。在研究期間記錄體重。處死時，將未禁食的小鼠用異氟烷（Forene, Abbot Scandinavia AB, 瑞典）實施安樂死，收集血液並分離血

漿，收集肝臟，並且將碎片（所有小鼠的左側葉的相同位置）用在PBS中的4%甲醛固定用於組織學或在液氮（N₂）中快速冷凍並且儲存在-80°C下。

肝組織學

【0170】用蘇木素-伊紅（HE）常規染色4 μm厚的甲醛固定的石蠟包埋的小鼠肝臟切片（每隻小鼠一個肝臟切片）。相鄰切片對膠原1A1（Coll1A1, LS-C343921, 美國博適公司（BioSite, USA））進行免疫組織化學染色。將載玻片在全景掃描II（3Dhistech, 匈牙利）中掃描，並使用圖像分析程式Visiopharm（版本2020.03.0.7300, 丹麥赫斯霍爾姆 Visiopharm 公司（Visiopharm, Hørsholm, Denmark））藉由檢測半乳糖凝集素-3或膠原1A1的染色面積/總切片面積來分析數位圖像。

【0171】藉由評價HE染色的肝切片確定肝脂肪變性。藉由測量脂滴的總量作為切片面積的百分比來確定總肝脂肪變性。藉由測量大脂滴的量作為切片面積的百分比來確定大泡性脂肪變性。藉由測量小脂滴的量作為切片面積的百分比來確定微泡脂肪變性。

【0172】藉由用半乳糖凝集素-3（Mac2）染色不同的肝切片並測定染色切片的百分比來測定肝巨噬細胞。

【0173】根據Kleiner等人報導的方法（Kleiner等人 Hepatology[肝臟病學], 2005, DOI: 10.1002/hep.20701）測定NAFLD活性得分（NAS）。NAS基於肝脂肪變性得分（脂肪變性 < 5% = 得分0，5%-33% = 得分1，> 33%-66% = 得分2，> 66% = 得分3）和炎症得分（無病灶 = 得分0，< 2個病灶/200x視野 = 得分1，2-4個病灶/200x視野 = 得分2，> 4個病灶/200x視野 = 得分3）的組合。在任何小鼠肝臟中都沒有發現肝細胞氣球樣變性，並且沒有預料不到，因為與人NASH病理學相比，這種情況在臨床前齧齒動物NASH模型中很少觀察到。所有組織學評估均由對治療不知情的委員會認證的獸醫病理學家進行。

RNA製備和qPCR

【0174】 使用RNeasy Mini套組（德國凱傑公司（Qiagen））從速凍肝組織中分離RNA。用cDNA套組（賽默飛世爾科技公司, 斯德哥爾摩, 瑞典）藉由逆轉錄產生cDNA模板，並用QuantStudio 7 Flex儀器（瑞典斯德哥爾摩應用生物系統公司（Applied Biosystems））進行即時定量PCR。使用商業性完整測定來分析小鼠*Pnpla3* mRNA的表現（Mm00504420_m1, TaqMan, 瑞典斯德哥爾摩歐洲生命技術公司（Life Technologies Europe））。使用正向引物 5'-GAGGAATCAGATGAGGATATGGGA-3'（SEQ ID NO: 39），反向引物 5'-AAGCAGGCTGACTTGGTTGC-3'（SEQ ID NO: 40）和FAM-TAM標記的探針 5'-TCGGTCTCTTCGACTAATCCCGCCAA-3'（SEQ ID NO: 41）（Sigma-Aldrich）作為參照基因，將結果標準化為小鼠核糖體蛋白大P0（*Rplp0*，36B4）。

統計學分析

【0175】 使用單因素ANOVA和Tukey事後檢驗（GraphPad Prism v.8.0.1., GraphPad Software, CA）檢查治療組之間的差異。藉由有序回歸分析來分析治療組之間源自肝組織學的NAFLD活性得分（NAS）的差異，隨後使用Šidák方法校正族錯誤率。小於0.05的p值被認為是顯著的。數據表示為單個值和平均值 $\pm$ 平均值的標準誤差（SEM）。

結果和結論

Pnpla3 ASO和可妥度肽組合治療對餵食誘導NASH的飲食的*Pnpla3*^{148M/M}小鼠的NAFLD、NASH和肝纖維化的改善具有累加效應。

【0176】 為了研究用*Pnpla3* ASO和可妥度肽的組合治療，將純合*Pnpla3*^{148M/M}敲入小鼠餵食誘導NASH的飲食36週。在最後14週，它們也用*Pnpla3* ASO或可妥度肽單獨或組合治療，並與對照ASO治療的動物（所有小鼠接受相同數量的皮下注射）比較。與對照ASO治療的動物相比，在治療期間，可妥度肽治

療而非Pnpla3 ASO治療降低了體重增加（圖1A）。Pnpla3 ASO治療而非可妥度肽治療顯著降低肝臟*Pnpla3* mRNA水平 $\geq 97\%$ （圖1B）。

【0177】如所述測定總肝脂肪變性（圖2A）、大泡脂肪變性（圖2B）和微泡脂肪變性（圖2C）。染色的切片示於圖2D中，每個切片提供單位面積的總脂滴百分比。如圖2A-C所示，與任一單獨治療相比，用Pnpla3 ASO和可妥度肽組合治療顯著減少了所有類型的脂肪變性。如所述，測定每種治療的肝巨噬細胞百分比（圖3A）和炎症得分（圖3B）。如圖3A和3B所示，與對照相比，所有治療組中的肝巨噬細胞和炎症得分均降低。

【0178】如上所述計算NAFLD活性得分（NAS）。與對照ASO治療的動物相比，Pnpla3 ASO治療降低了NAS（ $p < 0.005$ ）（圖4）。與對照ASO治療的動物相比，可妥度肽治療降低了NAS（ $p < 0.001$ ）（圖4）。重要的是，與對照ASO治療的動物相比（ $p < 0.001$ ），與Pnpla3 ASO治療的動物相比（ $p < 0.001$ ），以及與可妥度肽治療的動物相比（ $p < 0.001$ ），組合的Pnpla3 ASO和可妥度肽治療降低了NAS（圖4）。該等結果表明，用Pnpla3敲低抑制和雙重GLP-1和升糖素受體促效劑的組合治療對改善NAFLD和NASH具有改善的有益治療效果。

【0179】Pnpla3 ASO治療傾向於減少肝纖維化，測量為肝膠原1A1含量，並且可妥度肽治療也傾向於減少肝膠原1A1含量（圖5）。重要的是，與對照ASO治療的動物相比，Pnpla3 ASO和可妥度肽組合治療顯著降低了肝膠原1A1含量（ $p < 0.005$ ）（圖5）。因此，該等結果表明，用Pnpla3敲低抑制和雙重GLP-1和升糖素受體促效劑的組合治療對改善肝纖維化具有優異的有益治療效果。

【符號說明】

【0180】無

【生物材料寄存】

【0181】 無

【序列表】

<110> 瑞典商阿斯特捷利康公司（ASTRAZENECA AB）

<120> 用於治療肝病之組合療法

<130> 201129-US-PSP

<140>

<141>

<150>111119798

<151>2022/05/27

<160> 41

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 33500

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

gaacactgag ttcaagataa gaaatgttta taactctgtg ctggcagcca agagctggat	60
cccagttgca gatggggcta tgcgtagcag tgagagtggg agacacagag acagggactg	120
agagagagag agagagagat gggatcaggg ataagggcag tactgccagg cactgggctg	180
ggtgctttct gttcatcaca tttaacttca caatgcccct cacacaactg ttttctcccc	240
catggtacag atataaaaag tgaagctctg agagatgaaa tgatgcttgc gagtcttgtg	300
cactggctgt ctgatgccaa agcttgcagt ctcaacctg atatcatgtg cctgtcccac	360
tggaggctgg atggggggct gagagagctg gaccatgaaa cccttgccca gctgggtcct	420
ctctttgtct ctggaaagtg gggagggccc ccagctgctg tctacatgca gtgacgaaga	480
gggggtgagt cctcagccct gctcctgtcc tgcccacatc tgggtcacac tggggatgac	540
agatgtccag tgttgctggc caagaatgaa tgccggtgga caggaagaga atatgaatgc	600
ctgtggctgg tggcagggtg actcatctcg ggccttcggt cacagcctca aattcctgtg	660
ccagagcctg gccctcctgt cattagtcct aagactggtc atgcaatgca ggagggatgg	720
atgggtacag gaggctagag gttctgacct cagctgtccc ctccagaagc ctcagttccg	780

ccgcagccct gagcgtgagg tgggggtgga gggcagttag ggcaggactg taggtaatgc	840
ccctctccag caaagccaac acgtcaggaa tagatgggac cccctgtctg cttctcagct	900
ctcttgacct tccccgggac ttaggacctg accctgcctt gctctgggcc tccatctaca	960
aagtgtctat gtgatgaggc agtcagccca ggtattcact aaggcctgaa gctcccatgc	1020
cctgggattc ctgcccagag aaaggaggca gccctgtccc cagctccctt acccctccag	1080
gcaaggcaaa agcaaggact gcagcagaat ggggaagctc agttgaacat gaaccaccca	1140
accaatccag gtgcttctca ggtgacattt ggaatcctga cagcaatgtc acctgtttta	1200
caacaccacc agtcattctg cagttgagga cactgagcca caaagagggc agaggcctga	1260
cccaaagct cacatactct gcattcctcc aggtctcacg gagaaggggg agggcttcct	1320
ggtccactcc agctgggggc gctatggccc ggcagaccag ggtcctccag tgaggagctc	1380
tggaccaagg tctaacttgg ctccatgtac tgctgtgggc ttgctccacc cagtgccagg	1440
ggtaggtcaa ggtcaagggg cctcttaggc atctcctaag ggcatgctac tatccaaatg	1500
tttgtgtccc cactaaaggt catctgttga aatcctacac cttaaggtga tgatctttgg	1560
aggcgggggc ctttgaagg tgatttgatg agagggtggc acccttatga atgggattgg	1620
tgcccttata aaagaggccc agaggtagg atgtggcaag atggcacctt ctacgagcca	1680
tacctctcac cagggaccaa atctgttgt atcttgaact tgggctttcc agcctccaga	1740
actgtgagac agagaaataa gccaggcgaa gtggctcacc cctgtaatcc cagcattttg	1800
ggaggctgag gtgggtgatg acttgaggtc aggagttcta gactagcctg gccaacatgg	1860
tgaaacccca tctctactaa aaatacaaaa aattagtcag gcatggtggc gcatgcttgt	1920
aatcccagct actcgtgagg ctgaggcagg agaatccctt gaacccggga ggaagaggct	1980
gcagtgggcc aagatcgtgc cattgcactc cagcctgggg ggaaaaagat agaaataaat	2040
ctcttgtttg taagccccct cgttttaagg tgttttgitt tcgcacctga acggactaag	2100
ggactaaggg accaggaatc atccaggcct cagcttccca aagcactccc cactccccag	2160
ttcttacagg gccccgacc cagccccagc acccgtcatt cacatttttt atttacaag	2220
gaaactttga aatggacact tctgttact ttcatccaat gaaaaaatac ccagcactt	2280

gaaggcaatc atacagaaag cctgcaacaa cgcagagagt agactcttca ggtgggtggtg	2340
cctgcttttag gctggctctc cccgggtcaa aagggacgtg ataaagtgtt aaagtgatgt	2400
taaggatcaa gtgggcacca actgcgactc cctcccacc ccccgactta acagatgtca	2460
aggaaaacag aagggaagccg tttctctcca ggacatgcag tgtctgctgg agttttggaa	2520
aaatgctttc tctcgagtcg ctgcggggag ctcccaggct ggaccccccc gcacagggtcc	2580
tccgccatcg cctcccagc ccccgcccc aatccccctc ccagaccggg tccccgcccc	2640
catccccgc cagacgtcgt cccaccccc atccccctc aagccccgcc cgggagggcg	2700
tcctgccccg tcattgggcc tcccgccggc tcatttgcgt ggtccgaggg gggcggggct	2760
gacgtcgcgc tgggaatgcc ctggccgaga cactgaggca gggtagagag cgcttgcggg	2820
cgccggggcg agctgctgcg gatcaggacc cgagccgatt cccgatcccg acccagatcc	2880
taaccgcgc ccccgcccc cgccgcgcg catgtacgac gcagagcgcg gctggagctt	2940
gtccttcgcg ggctgcggct tcctgggctt ctaccacgtc ggggcgacct gctgcctgag	3000
cgagcacgcc ccgcacctc tccgcgacgc gcgcatgtg ttcggcgctt cggccggggc	3060
gttgcactgc gtcggcgctc tctccgtat cccgctgggt gcgtctgggg acgctgcccc	3120
ggctccacgt gcggagtggg tgccccctag gccggggagc gggggatccc caggggtcgc	3180
ggggccctgg aggagcgggc atcggacgcg gacacggcgg ggtgcatccc gagggcccc	3240
tccgaggcag atgcttcctg cgggggcgct gtccctgggc ccgggaaggg ggcgttgaa	3300
ccccgagcgg tccgggccga agcctgggac tctcgtcgt cccacccct accccatca	3360
ggcggcgtg catgaaggga gacctcacc tccgactga gagtcggagc gtctcggagc	3420
gacggggagt agggagcggg acccggggcg gagggtagt ctggccctg cggactccgg	3480
gtccctgtg tcctctcggg aggggctgga cgggctgagc tgccgagggg ccgatttgc	3540
ctgggccgga caaagagtgg ggctttggcc ggtccccac ggtgggctcc ttcctctgg	3600
ggattgaggg actcaagaca cccgcgcct gcgctttct tttcttttt tttttttt	3660
tttttgagac ggagtttcg tcagtcgcc aggctggagt gcagtggcgt gatctcaact	3720
cactgcaagc tccacctcc aggttcacgc cattctctg cctcagctc ccgagtagct	3780

gggactacag ggcagccca ccaagcccgg ctaatTTTT gtatTTTTa gtagagacgg	3840
ggtttcaccg tgtagccag gatggctcgc atctcctgac ctctgatct gccacctcg	3900
gcctcccaga atgctgggggt tacaggcgtg agccactgct cctgctgcc tacgtctct	3960
gggtcgcagc ccagccttct gggggctggg tagcctccca gaagggaac cctgggcac	4020
ctccagggca ggctaactgg agtctagtgg ggaggggtac ctgaaagag gaaagtgtt	4080
tcctcctcct cctcctcctc cagtgtttgg gaccttcct gggggctgga gtgcatcct	4140
ggacaccccc caatcccatc ctcttctcta gtttccactg acctaggccc acctccct	4200
ctccggctca gtactcctgg aaatgagatt ccgtacattt gaatcttgc ctaatgaaat	4260
atttgtccat gtgggtacct gtgtgtgtgt ggtgggggtg cagacggagg gtttgttct	4320
cactagctgg aactactggg gtgtgggtatg ctctctggga attgtgtgc cacagtctg	4380
gaggcgagga gggggttgtg agccagtagg caggggctgg ggcaagtagc attgtgaagc	4440
tattgacacc cagacgtccc caggcaggag attatgcccc cattagcccc cttttatctg	4500
ggcttcctta acaatggact ctttgccctg cctgccagag ccagcaggga gtgactgttc	4560
agtgtgagg aagcgggcag aggaagccct gccattgggt aggagcagtg ggcagccct	4620
gggctgactg ggaggtgggg attagggtt agacagtcct ggctgtctgc ctccccctaa	4680
gccaggggga gaggagcaaa gggcacgaaa tgtggcctcc aggaggatta gaccgccaca	4740
tgatcatttg cacaccctgg ggtttagcaa caataaaagt cagctTTTT gtatcccaag	4800
gtggcctgtg gacaccaca tggacaaatg ttacactgg gacagaattc aaatgcagag	4860
gtcccaggag cctaaagtac actcactctg gtatagaaag gattccttac tgggcagagg	4920
acaggtgcag cctggggctt tcccaggcag gacacaggga ggctcaggaa ccaccaagtc	4980
cctggaaggt ggatctggag gcgttggcag gagccactcc ctgggttcca gggctccagg	5040
ttctgtctt aacccctgt ctacagagg gctgtgact tgggggctgc tgagcatgtc	5100
ccagaggctg catcctggac acagcacctc agtgcactg agctgaggct aacttggcag	5160
gagggacagg cagaacctgc cagccactg caattccacc cctctggcca ctgagggaag	5220
gagagctgtg agtcaagatc agatttgggt caggacaggc tggggcctgc ctgtccctgt	5280

gcatcccaag atttatggct ggccaggggt tgggctggga ggggtggtct tgcattgccag	5340
gagagtgcag atcagcciga gaggccaggc cagtaagta ggtcagatct cctgcacctg	5400
atagcattaa ggccatctac accaaagctc taatgctgat atgttcctgg cctctatgtg	5460
gggcatggag gtggggcatg gaggtgaggc ctgctcgctt gggcttctgg aagtgggaga	5520
ctcattcctg tggctgaggc ctacagcagt gctgtgtggt aggaatacac tggaagccat	5580
gatgtcattg tgcattttct agaagccaca ttgaataaag taaaagacac aggtagaatt	5640
aatttcattg agcccaatat atccaaaata atatcatttt cacatctatt caatataaaa	5700
atttactaat gagatatttc atactaagcc actgaaatcc agtttgtatc ttacacatct	5760
cagttttgac gagccacatt tcaaggcgct gatagccaca tgtggctccc atagtagaca	5820
gtactggctt agagaaatgt tgggtggcatc ctgtctgtct ggtttctggc cttgccaaaa	5880
gtattacat cccagtgtgg tacattcttt catgtatttg tctcctgtcc ccagagcaga	5940
ctctgcaggt cctctcagat cttgtgcgga aggccaggag tcggaacatt ggcatcttcc	6000
atccatcctt caacitaagc aagttcctcc gacagggctt ctgcaaatgc ctcccggcca	6060
atgtccacca gtcactctcc ggcaaaatag gcatctctct taccagagtg tctgatgggg	6120
aaaacgttct ggtgtctgac ttctggcca aagacgaagt cgtggatgta agcagtttgc	6180
ttatctggac gttgtcaagt tagaaaagct gttttgggat ggggtgtggtg gctcatgcct	6240
gtcatcccg cactttggga ggccgaagcg ggtgggttgc ttgagcccag gagctcgaga	6300
ccaacatgat gaaaccagct ctctacaaaa attacagaaa aattagctag gcatggtgtt	6360
gtggggccat agtcccagct actagggagg ctgaggcagg agaattgctt gagcctggga	6420
ggtggagggt gcagtaagtc atgatcatgc cactgtactc cagcccgggt gacagtgaga	6480
tgtgtcttg aaaaaaaaa aaaagaaaga ctgttttgtt ttggaagcaa cacaggcagt	6540
tgtaggcccc ctgtgccaga gtgacataaa ctctgtacac ctccagtgtt ttggtccatg	6600
tttgtaaacc ctgaatgttc cagggcagtt tcttttcttc actttttatc tcttttttt	6660
gggtgggggg gcgggttaca gagtcttgct ctgtctccca ggctggagtg cagtggcgca	6720
atctcaacct cccgaggagc tgggactaca ggcacaggcc atcacacctt gctaattgtt	6780

gtactttttg tagagacggg gttttgccct gttgcccagg ctgggccaa actcctgcac	6840
ccaagtaatc tgcccacctc tgcctggcag ttacaatttc aaataattcc tccctttcct	6900
tcaacacttg gctcatgacc gtccagtcga aggaacctgt cctgcaggtg tgcctctccc	6960
gagcttcttc tatgcatctt ccataatgaa gatgccttct cactggaaac cctacaaggg	7020
tgggaacgtg ccttatttgc ctgtatcttc aggggtctagc agagagaaga taatttgtaa	7080
tacaaaaaca ccattaaatt cagctgatgc ttccataagc gctccttgga ggaaggactc	7140
catttacttg acagatctgt gcaagacagc agcctggcgc gtctaacctg cagccagttg	7200
catcctctgt ttaaccttgt ttgcggaagc ttctctctaa cagccagcac ttgtctgttc	7260
ccacatgggt ccgttctccc agtgaatcac cgtggctgct gctgactgct ctgtagcaca	7320
gtgcttcgca aagtgtgac ctgggaccag cagagcagca gctcctttga gcttattgga	7380
atggcagacc ctgaggtccc acctctgacc tctgcatgg gaattctggg gagggacgca	7440
gaatctctgg ttccacaggc tctccggtga tgctaataaa taccggcatt tgaacagcac	7500
cgatctagcc ctttcagtc catgagccaa caacccttgg tctgtctgt ggtgaccag	7560
tgtgactctc atggggagca aggagaggaa gttgaagttc actgacaggg ttgttaaggg	7620
gattatgcaa tagatgagac ccattggcct gaagtccgag ggtgtatgtt agttccccgt	7680
tcttttgacc catggattaa cctactctgt gcaaagggca tttcaagtt tgttgccctg	7740
ctcacttgga gaaagcttat gaaggatcag gaaaattaaa aggggtgctct cgcctataac	7800
ttctctctcc ttgtcttca caggccttgg tatgttcttg cttcatcccc ttctacagt	7860
gccttatecc tcttctcttc agaggcgtgg taagtctgct ttctctgcta gcgctgagtc	7920
ctgggggcct ctgaagtgtg ctacacatc tctgacctgc agggcactgg tgtcgggcac	7980
ctcagggtct gtccatgggt ggagcccat gcctcactgc cttcagaca gagtagccac	8040
agctggccct atttccaggc taccgggca gaaaacitc ctgcatgtgt aattaattat	8100
ttggctatct gtaaggtaaa ctggctgggt cacttaatct gcaccttaag catcagatag	8160
cttctcagtg atctagttaa actatatgat gttgcccagg cgcggtggct catgtctgta	8220
atcccagcac tttgggagcc tgaagcaggc agatcactg aggtcaggag ttcgagacca	8280

gcctggccaa cagtgtgaaa ctctgtctct cctaaaaata caaaaattag ctgggcatgg	8340
tgggtgtgcac ctgtaatccc agctgtctcg gaggtgagg caggagaatt gcttgaactt	8400
gggaggcgga agttgcagtg agccaagatc gcaccactgc actccatcct gggtagacaga	8460
gcgagactct atctcaaaaa gaaaaaaaaa aaaaaggtaa ataaagtata tgacactgaa	8520
gaatctgtta cccctggaag gtggagcttt actcttaggg ggaactataa cagtcataata	8580
tatatat tttcttttct tttttttttt ttttgagatg gagtctggct ctgtcgccca	8640
ggctggagtg cagtgggtgca atctcggtc actgcaacct ccacctcaca gggtcaggca	8700
attctcctgc ctcaacctcc cgagtagctg ggattacagg tgcctgccgt cacgccaagc	8760
taatttttgt atttttagta gagacagggt ttcatacat tggccaggct ggtctccaac	8820
tcctgacctc aggtgatccg cccgccttgg cctcccaaag tctgagatt acaggcgtga	8880
gccatgggtg ccggccaaca atcacatgtg ttgtaacaa caacaaaaat ctgtcagcct	8940
ggtctaacct agatttgtgc tttgttttgt tttgccactt tgtgatgcac aggaggaagt	9000
ttaggctgta aaatactagc cttttagggt aatttttgaa ctcaacagag cagcagcgga	9060
acctttgatg caatcctgta tgtagcacca gcagagccac gtggcagagg gactcgcatt	9120
aggagcctcc cattacagac tacgtgtccc tgtgcgttat cttatagggt ccccaaac	9180
aaggggagat gtgattattc atcctgtgtg gctgtgggga acttgagagt catacttgcc	9240
caaagagcac ggccagcgag ctgtcaccca ggtcactctc tgcctctctg tcagaacagg	9300
gcattgtctt gttcactgca gggcggtctc tctcattctc ttagtittgg ggtccaggat	9360
agtgtccac ggagccactg gagtgcccag ctactgagt accaaagcat attttgatt	9420
tccgacattg ccacagcatg gttgggcac agcaggaccc caacccttg ttatgttgt	9480
ggctttatgt ggttatitga tcttccccag aactcagcag gattgcaccc agcagcaccc	9540
tagtgatgt ctctggctcc ccagtgcacg gtcttggtt tcttcttg tcgagagttt	9600
caagccctct gggtcctact ctgtcctttt cagcccatag ctttgttcaa aagctgtgg	9660
cagtgttcag atttggctga gttcagtga tatgtgcatt ggctgatttc tgagccatgc	9720
cagggggatg gagaagccga agcaggagt tttgttctgc aggtcttga gtaggcattg	9780

ggctctgtgcc ggctcacttg ctagtctttgc atccttcccc aacccccctct ggggatgtct	9840
ggccacatca gaagacagtt tgggtttgtca gaactggggg agtaccaggc cgaggtaggt	9900
ggatcatgag gtcaggagat cgagaccatc ctggctaaca cagtgaacc tcctctctac	9960
taaacatacg aaaaaaatta gctgggctgt gggcgggcg cctgtagtcc cagctactcg	10020
ggaggctgag gcaggagaat ggtgtgaacc cggggggcgg agcttgcatg gagctgagat	10080
cctgccactg cactccagcc tgggcaacaa agcgagactc cgtctcacia aaaaaacaaa	10140
aaaaaacaaa acaaaatctg ggggagtgcc actggcatct gatgtataga ggcccagat	10200
gctgtgtcat caccggttga gtgcgtcat aggcattctc ctgacaatta gaaccatta	10260
ttcttcaaat tcaatgcaag caaatcaaa gcattactgt gtacataccg catgctaata	10320
aattgcacca ctggagctcc taaattcaaa acattactat aaaaaagttc aaaatgcatg	10380
gaaaagtgtg acatggcagg agaatatatt ggcttctgac tacccttga atgaagatga	10440
tccaccagcc gccttcctcc ttggtcttca ctccagattc ctagcatttc attctgtgtc	10500
tctttatgca gtgaggtttt tgtttgttt ttgagacaga gtctcactgt atcacctagg	10560
cctggagtgc agtggcgca tctcagctca ctgcaaccct cggctcctgg gtttaagcga	10620
ttctcctgcc tcagcctccc gagcagctga gattacaagc acacatcccc atgccagct	10680
aatttttgta tttttagcag agacagggtt tcaccatgtt gccaggtg gtctcgaact	10740
cctggcctca agtgatccat gtgcctcagc ctccaaagt gctgggatta caggcgtgag	10800
ccaccatgcc cagctcctag tgaggtttt gatgccttg tacatctgcc ctagaaattg	10860
tgtgactacg attttgaaa tgttgctgtg taaactttg atcatttctg gactccaggc	10920
aagaatcttg atggctaagg tgtggctgaa catgtctgat tctctcctgg acctgtttta	10980
ggccaaactc tgctctgaaa ttcctccgtg tggaaggcgg ggcctgggag agcctcccag	11040
ctggaatctt ttggatgcct ttctctgtgg gtatctgatg gctggctctg atggctggct	11100
gtgatggctg tggctggaaa tcattgttga catgagtctc acagatgcag gctctgtcca	11160
aattgtagca aaagctgcct gcccagccg agctatgggc aataagggtg tttaaggata	11220
tagatgaagg aaaactcacc cttagaataa ttatccaaa atgtgtctgt gttgtgggtt	11280

agaggacatt ttctgaggtc ccaggttcat tgtttcattt aagtcetcaa agtcctcca	11340
ggtgttggtt ctaattgtca aagcatgggg ggagatgggc tcatgggtta aaggcttat	11400
cccagatttc tgtatcctcc ttgcaagcag caaaggggtc tggatttgaa tccatgacca	11460
tgtttctcct ttgggtttcc atcacactct gtccccgtgc actgagcacc ctttagttca	11520
tatgaccccc ttaggcatgt tacatgggca ctccatatagg tgcccatctg gccctaggac	11580
ttggccaaca caacatggac tccagtttcc atctgccctt ttgccaggca cttttgtgca	11640
gtgcacacac tgtacaacag tagacggcaa cctgagagc cagagtagag cctgtcctag	11700
caccggaatg ctcggttaagg atttgtcgca ggagtgttc caaagccaat gtcctccctc	11760
catatcagcc tgtttgtggc tctgagaagc tctgccaca tgtgaaagct tgttaagcac	11820
ttaagcacta acccagagct tcagacagtg ccagtccttt ttccccctct ttaaaagcga	11880
tatgtggatg gaggagttag tgacaacgta ccttcattg atgccaaaac aaccatcacc	11940
gtgtccccc tctatgggga gtacgacatc tgccctaaag tcaagtcac gaactttctt	12000
catgtggaca tcaccaagct cagtctacgc ctctgcacag ggaacctcta ccttctctcg	12060
agagcttttg tcccccgga tctcaaggct agttgggtgt gagggggcag gtgttctggg	12120
gtgcagctct tctttgcctc cctgattgcc aggagctacc agttactgtc tgcacaatca	12180
aacagaaata gacctgtcct tgatgggtta cggaataaaa aggcgcttgt ccagaagct	12240
caggtgaggc accaccctga ttatgggaat cacctgggaa catatacca gacctaaaac	12300
tcagatccac ttcccaggct gtggttatat agtcaggggg gtgcagtatg ggtattagga	12360
ttttttattt tttagttata aagatttttt ttgtgtttgt ttttgagaca gggctcttct	12420
ctgccgtta ggctggagtg cagtgggtga atcatagctc actgaagcct cagactcctg	12480
ggttcaagca gtccctccac ctacgctcc taaggagctg ggacccacag gcatgcagca	12540
ccacacctgg ctaattttta aaaattttgt ggagtgttgc ccaggctggt ctacactcc	12600
tggcctcaag cgatcctccc acccagcct cccaatgtgt tgggattaca ggcatgagcc	12660
attgtacca gccactaaga tgattcttat ttggaaacac ggtaagaac aactgcgttc	12720
ggtagtttaa ctttttttga ttgtgggtgt tttagtatgc cttaccactc taccatagta	12780

agaaatttgc agaccatgta caccaacctt tgggtgctcct ggggagaaaag aaagaaggct	12840
atgcaatgca atgcatgctc acagtccaag ggagagggaa agctgtctaa caggattggt	12900
tttcccgtgt gctttataag cagatgagta gaggagacag ctcttattgt cctagtggca	12960
attgggatat gctgcaaagt ttgttaggggt ggaggcttat tccgggacca agggagccca	13020
aagaaacaag ctccgtccag gcgcggtggc tcacgcctgt aatcccagca ctttgggagg	13080
ctgaggcagg tggatcacct gaggtcagga gtttgagacc agcctggcca acatggtgaa	13140
accccgctctc catgaaaaat acaaaaatta cccgggcatg gtggcgggca cctgtaatcc	13200
cagctactag ggaggctgag gcaggaaaat ggcttgaacc tcggaagtgg aggtggccgt	13260
tagccgagat cacgccactg cactccagcc tgggcaacag agcaagactc tgccttaaaa	13320
aaaaaaaaa aaaaaagaaa agtaaaagga aaaaaagag gctctggcct gctgggggtgc	13380
ctgcaaagtc tccgtggaag ggtgacattc aagccgagac ctccagggaa ctgtctcctg	13440
ggagcacaga gccctttgct cagccccag gtggctcagt gccccagcc agcagactca	13500
gagcttgcat gattctttgg tgctctctgc ggtcttccaa tgatgctgaa ataaatggtg	13560
cttgggtgtc ccctgtgtga gtcccttgc ttgctttgct cacaggtgct gggagagata	13620
tgccttcgag gatatttggg tgcattcagg ttcttggaag agaagggtat gtatgggctg	13680
ggaggatcag ccatgccctt ttgacaagca ttactagcg gtcttggtaa agacttgaga	13740
tttgccttag ttctaacact tagtgccaa cgccttcctt gtgttgctca acctactcat	13800
gagcccagga gataggaaat ctccgtccca ttgtacagat ggggaaacag aattttggaa	13860
aggagagcca agcagcacac accctccct gaggggcaga gccgagattt gaactgggat	13920
gtcatgactc cagggccctc tccctccca ggtccctt atctgaaggc ggtttttctt	13980
tccagctega cctcttgtga cccttagttt aacaagggcc gaagttaaag agtttctgcg	14040
cctggacccc aaatgaagca atcagatttc tcattctccag tcagggtgtg gtccaagccc	14100
actagacaag ttgtctcttc ccagagcaca ttcttgctt caagtcatcc tggtttgtca	14160
gggctggggg agttctgtg tagaaatatt agagtggaag gaaaaagatg tgttgggagc	14220
tatttttctt taatactaaa agttgggtga tgaatttgc gttggccaag accaaggaga	14280

ctgcattttt aaggacatat gtgtatttat ctgctcagaa aatgttcatt gctgtgtgct	14340
agggatactg cagtgaacac agagggtgtga cccttgccag ccttgtgaga gaagttagca	14400
gataagtaag cagaagggtg atgctgtgtc gatgggaaag tacaggtgcc aatgagaagg	14460
cacagggtgtc aaggagaaga cacaggatgc tggaggctca tgcaggatgg atctccaagg	14520
cccaggggaa gaagggcctc tcggaggacg tgaatccaca ttaagacttt ggggataagt	14580
aggagcgcct taggcatggg gacccatgga tgcgaggcct gtaggacaca gacaggatgg	14640
catgaaggcc tgtgcaactg gaggggtggg gatggggaca ctaagagatg gctggaagtg	14700
tgggggtggg gacactaaga gatgactgga gaagaggggg tcaggagtgg tgaaaaatgg	14760
gagaggaggg caggctgggc cttttggata cagggggatt gcatcctgca gtggtaggga	14820
gccactgagg gctgctgcag taggagttag ggatcagag gagagctttg gaagccccct	14880
ggatgcggga caggaagcga gataccagtg tctaggaggc cagttaggca gccacaggct	14940
ccaccaggat cagggtctgcg aggggtcatga ggaggaaacc aatttgaagg agtccagggg	15000
aataggactt ggaaatgacc gatgggacat ttgggaagag gaagacagaa gagcgcagtc	15060
ccggcttctg gcttttagcag ttgggcaagg ggagatgggg agatgtgccc atgggttag	15120
ggttagggac attaggaggg agccggtatg gcaggaagag ctggtgtgcc agagatgctg	15180
gaagcagcat ctgcctgaga acagatacct ggcaatatc ctaagggaaa gtgacatctc	15240
ggagggtgag gagggcatct gatagggcct ggaaagagcc ggggcaagca tgaatgtgag	15300
gttatcttgg ggggcaaggc tcaggcgttg aggagcagcc cctggtctct tcagcctgaa	15360
gttgaagcc agagttaggc cagggtcagc tgtggttgc tgaagtcccc ctccccagc	15420
ccagtgtgcc aatgctgtaa gagcaagggc cgtcactgg tgcgtgtggc tgagtcccag	15480
caccaggac agggcctggc acatactggt gccaatcct cccttctggg tgcttcttc	15540
aaggccttgt gatggaagtg agtaccctct tcgacatcag acccagcttc aaatcctggc	15600
tctgctatgt attggctgcg tggttttaga caagtctttt aaccttgctg tgcttctgat	15660
ttctcagctg aaaaatggag atgatgatag tggtttctgt aaggccttat ggtgaagcac	15720
ctagctcagg gcctggaagg cagggtgtac cagtggttca gttgttataa accaacta	15780

accctcgcc	ttgcacctca	tgaaccaga	tatgtatg	gagcccaca	agctagcagg	15840
agccaagctc	acgtgtgtcc	tgttttaaag	ccccataccc	ctttctccgg	gtgacaaaca	15900
cctgtgctcg	ttctcttccc	tccccctctt	cccccttgc	ttggctaata	acaggccagc	15960
tgcctgcctc	cctgcagttt	ggtagatggg	tgggtaacga	ccaccactcc	cacgttcgcc	16020
tgatgggctt	gttttccgtg	cccttcacag	gcctctgcaa	caggccccag	ccaggcctga	16080
agtcactctc	agaagggatg	gatcctgagg	tcgccatgcc	cagctgggca	aacatgagtc	16140
tggattcttc	cccggagtcg	gctgccttgg	ctgtgaggct	ggaggggagat	gagctgctag	16200
accacctgcg	tctcagcatc	ctgccctggg	atgagagcat	cctggacacc	ctctcgccca	16260
ggctcgctac	aggtacccac	tctctggggg	gagcacgggc	agcaccttgt	tttctttctt	16320
gtgcattatg	gaggaagatg	gtactgccac	atgggagcga	tagggtgagg	caaccatgac	16380
agggtggttg	gaacatctcc	ttccatgtgt	acagcctggg	ctgctgccat	cactcccagc	16440
acagccccc	accccccaa	tcttgaacc	ttgccaagtc	tcccttccca	tggggtc	16500
accaggagga	aaacaaactc	cagctgagcc	ccttgggggt	ccccatatag	gctcctgcct	16560
gtggcagctg	ggccctctgt	accccttcc	aactctgtct	ccctaacatg	gcacctgagc	16620
tcttccatc	ctggatttca	tggaccccaa	ggatgggggt	cctgcatctg	ggacttggcc	16680
tattactcgg	agctcctttt	cagccgcctc	cctccacctg	tccaccacc	tcaaggctcc	16740
tttcttgaga	cctctcctaa	tttctccctt	cccctaaacc	cacaattttg	aacctccatc	16800
gaatggtgct	gtattttata	atgtcatcaa	atatcaaag	gagacagtgc	tatggtccaa	16860
atgattgtgt	acccccaga	atttgtcttt	tgaatccta	acccccaca	tgatggtctt	16920
aggagggtgg	gcctttggga	ggagattagg	tcatgaggaa	agggtgtca	tgaatgggat	16980
tggtgccctt	attaaacaga	ccaagagag	gtcccttgtc	ccttctactg	tgtgaggact	17040
cagaagggtg	tgtctatgaa	gaagcaggcc	ctcaccagac	accaacatgt	ctgctgcccc	17100
ttgatctggg	accttgcagc	ctctagaact	ctgaaaaatc	gatgtttgtt	gttttataag	17160
ccactcagtt	ggtggcattt	tgttagagta	gcctgaacac	ggactaagtc	aaacagaaga	17220
accacaaac	cagctacaga	gttgggcatt	tggagaaatt	caaaaatgag	tcagacataa	17280

ctccttattc ttgaggtgcc ctaagagatg ggacacagca gctgcccagg tgcattagtt	17340
tgttctcaca ttgctataaa gaaataacctg agactgggta actcataaag aaagaggttg	17400
aattggctca cagttgcaca ggctggacag gaagcatggt gctggcatct gctcagcttc	17460
tggggaggcc tcaggaaact tacaatcatg gcagaaggta aacgggaagc atgcacatcc	17520
catgactgga gcaggagtga gagagagagg gaaatagagg gaagggtgcca tacactttta	17580
aacaaccaga tctcatgaga acacattcac tatcaagaga acagcaccag tggggaaatc	17640
cgcccccatg atccaatcac ctcccatcag gctccgcctc caacactggg aattacaatt	17700
tgacatgaga tgtgggcagg gacacagatc caaacatat gaccagatta atacgatttg	17760
aggcatcacg aggtcattaa agagagggaa taaaagactg gggctccagg aagaaggctc	17820
tggaatccag cagagggtca aggaccagct tgtaaagctg gtggtgcctg agaagtacct	17880
aggagaacat agatgctgtg acgtttgatg tagctgtttt ttgttttgtg ttttggtttt	17940
tgagacagag tctcactctg ttgccaggcc tggagtgtgc agtggcgtga tcttggctca	18000
ctggagcctc catctcccag gtccaatga tctcatgcc tcagcctcct gagttgctgg	18060
gattacaggt gcacaccacc acgcctggct aatttttgtg ttttcagtag agacagggtt	18120
tcaccatgtt ggccaggctg gtcttgaact cctgacctca agtgatcaa caacttcagc	18180
ctcccaaagt gctgggatga caggcatgag ccaccatgcc cagcctgatg tagctgtttc	18240
tgtgcacatt atttgctgtg gggatatattc agatttccta atacaagatg attctttgcc	18300
tcatgactta cacaccattt tctatttaat ttcagctatg atattggaaa tggacatgtc	18360
ttttcaagga aaataaaagc aggctttctg gaatggcgac ttccaaacat atttgtcaat	18420
ttaaaggagc tgggagtggg gacctatgc tccgtaagca ctctcttagc tgttcttggc	18480
tgtgctcccc gcttcagctt cacactgccc ttgctgtgaa gggagcagcc tgggccgggc	18540
gcggtggctt acacctgtaa tcttagcact ttgggaggcc gaggtgggtg gatcacctga	18600
ggtcaggagt tcaagaccag cctggccaac atggtgaaac tccatctcta ctaaaaatac	18660
aaaaaattag ctgggcatgg tggcagggtc ctgtaatccc agctacttgg gaggctgagg	18720
cagaagaatc gcttgaacct aggaggcgga ggttgcatg agccgagatt gcgccattgc	18780

actccagcct	gggggcaaca	agagcaaaac	tctgtctgga	aaaaaaagaa	aggagcagct	18840
tggcaaacc	caccttgctg	cttttgtgag	tgcctctgac	ccittggctg	ccaggacggg	18900
cgtattttat	ggaaatgcta	agcaccaaca	gagtaaagtg	gtttggtttt	tcacagtgg	18960
gggagataat	agctccaaat	tgtctttttc	agcactgagt	gaagaaatga	aagacaaagg	19020
tggatacatg	agcaagattt	gcaacttgct	accattagg	ataatgtctt	atgtaatgct	19080
gccctgtacc	ctgcctgtgg	aatctgccat	tgcgattgtc	cagaggtgag	cattttaggt	19140
ggctccgtgt	cttcttcaca	gggttgatat	gaggatgaaa	caagatgata	gatcatgggtg	19200
gcatgtagtc	tgggacctgg	attgtcgtgc	cacagatcac	agctcacagt	ctatgtgcaa	19260
tgcccctgaa	tgttggccac	ctgtctctca	gccacacatg	cacctgtaac	tcagtgcaag	19320
cccagaaact	ccccgtgggg	actcctagag	ctgtcagtgg	cctcacatag	cagctgggcc	19380
agtctcttgt	gattgcccc	ggaaactgag	gcctggagag	cttgggggtca	ctgctctgag	19440
gccatagaga	tgcctagtag	aaggggccagg	cctagaagca	ggatccttgc	tgccccctctg	19500
agctgtttcc	atttaaaatc	acatgaaggc	cggcgccgtg	gctcacggct	gtaatcccag	19560
cattttggga	ggccaagggtg	ggtggatcat	gtgaggctcag	gagtttgaga	ccagcttggc	19620
caacatgggtg	aaatgccatc	tgtactaaaa	atacaaaaat	tagtggagca	tgggtggcacg	19680
tgcctgtact	cccagctact	tgggaaggctg	gggcagaaga	atcgcttgag	cctgggaggc	19740
agaggttgta	gtgagccaag	attgtaccac	tgcactccag	cctgggtgac	aggagagaaa	19800
ccctatctca	aaataaaatg	aaaggtaatg	aatgaataa	aataataaat	caagtcacgg	19860
ccgggcacgg	tggctcacac	ctgtaatccc	agcgcttttg	gaggccgagg	tgggtggata	19920
atgaggctcag	gagttcaaga	ccagcctggc	caacatgggtg	aaaccatgtc	tctactaaaa	19980
atacaaaaat	tagctgggca	tgggtgtgca	tgcctgtaat	cccagctact	ccggaggcta	20040
aggcaggaga	attgcttgaa	gcaggacctg	ggaggcggag	gttgggttgca	gtgagccgag	20100
atcatgccac	tgcactctag	cctgggctac	agagcgaaac	tccgactcaa	aaaaaaaaaa	20160
aaaaaaaaat	caaatcacat	gaaagtagaa	catagggaat	tccatctttc	gttctaggca	20220
tagtttgta	atatgattca	gagccagcag	ttaggagaac	acagtgtgac	tctcctagaa	20280

ctctcttgatt gggcttctc tgattgggtt tcctctgatt gggcttctc tgaaagtggg	20340
ggggatgggg ggtggggagc agaatggta gagcttggct cagcagtcag actgctcttc	20400
ttcaaatcct ggctgcattg ctactacag ctgtgtgact ccagatgact gaatccacct	20460
ctctgtgctg cagcttcccg tctagagaga tcacctggag cagaggggtg tcaggagact	20520
caatctggtt actgactcac agtgcaggag tactcatccc atagtaagca tccagctaga	20580
gatgttgatt tctattttca ggtaataatg atgacgtaa aattagagac agataaaagg	20640
tatgggcatt aggccagggc actgcaattt ctaagctgtg tgacctcagg caagt tactc	20700
gacttctctg agccctcagc gtttcatccg caatataatg ataggaaaac cgacctcagt	20760
gggttgtctg acagtggagg gcacttgatt aaaaaaaaa aaattaccct ggtctgaata	20820
ttaccctgga ctgaaagaaa aatattgagc taatacaggc atcaggaatg gggctgcagg	20880
gagtcaggg aagggagAAC gaagagcctg aagggtgtgag gaggtgcgag tgctgatctg	20940
tctgtacaa agaggctgct gagcctcctg tggatgtggc cctggacttg gcagtttaat	21000
acctgagctg ttaaaataac ctgagatgct gtgttcttta aggggtagga ttcagattcc	21060
tgctgaaatg cttctgaaag ggagggaatg agccagccca tccccagttg ctttttaaga	21120
tcattgggaa gttctggctt tgccatttgt ccttggaaca ctcttaggtc ctctgcccc	21180
acttccatct ggggtgtgtg cctgggctgt ccaccacaca gctacatcct gccatcttcc	21240
ctctggagc cactgtgcca tgcatggatc ttagcttca ttttcttgg cttttccctg	21300
gtttttctgg agcagagtct ctagtaaac cccaaggag aaacgtttg actttatgtg	21360
tgttgggaaa cgtgcttttt ttctattaca tctcagtat aggttgcca tgtctagaat	21420
tgcaggttga aaatcatttc ctctcagtat attggttagt gagaagcctg ggactgagac	21480
agtcacattc tcacttcttt gcaggtagt gctcttagga ctgtcttttt atcccttata	21540
ctctgaaatg tcatatgtct tgggtgaagt cttatttca gttattgagc tggacaagta	21600
ctggagaccc cttcagtcaa agccttctgt cattctccag ctctaggaaa ttatcttcta	21660
ttgttatttc tgttattcct tcccttccat tttcttttt ctttttttt ttttttttt	21720
gagacagggt ctactctgg tgcccaggct ggaatgcagt gacctgatca tggtaactg	21780

cagcctgaac ctcccagact caagtgatcc tcccacctca acctcctaag tagctgggac	21840
tgcaagcaca catcaccaca cccaacaaat attttttaaa aattttgtaa gatgggatct	21900
tactatgttg ccagacatft ttcttctctt tcttggggct cttattagga agatgtttga	21960
cttcttgggt tggattcttg tctccgtgtc tgactttctc tctttgtcat atttttcacc	22020
actcgttgtc tttttgcgtc tgctctgaca gatttctca aattttgtct tctagtccta	22080
tcctacagtt ttactttca gcaaatataa tttaatctcc aagagtactc tcttgttctt	22140
ttttcttagc attctgttct tgttttatgg atgtaacatt ctcttggaaat atttgcctgc	22200
ctctagatca tcccttctcc atttcttctt gggctagttt ttctgtttct tcactttctt	22260
cttttatgct acttattctg ggcgtgttct tgggtgggtt ttcccatat agcaacagag	22320
gacttggagc tcagggagaa aagggtaggt gcatcacctg gcagagctcc cagacagtga	22380
caggcaggct gcggaagga tgtctacttg gcggtgtctac cgttttctta gaaacccttt	22440
ccctggagct gggtgaactg ttgggttttg ccctgggtgt gaacgctggc tccccgtgct	22500
ctgcctgttt catcaccagc cccctccctt tctgcctggg gtccagtaat ctgttgaaat	22560
atatatcttg ctcaattggtg agctcctgtt ccttctctgt tgctcttgca gatttatcac	22620
ttctcgtaa gctgcgcttg tacttcggga ttttctctgt gccacactgg gaaacatagg	22680
gtggttgcat gctgcagtc tgagcactta ttctactcac atctttacac gaagatttgg	22740
tgggtgttta ctttgttttt agtaagttag tctgtcatgt cctttgatcc ttttttttg	22800
ttttttgaga tggagtctct ctgtgtcttc caggctggag tgcaatgtcg cgatctcagc	22860
tcactgcaac ctccacctcc tgggtcctaa agattctcct gcttcagtct cctgagtagc	22920
tgggattaca ggcatgtgcc accacacctg gctaattttt gtatttttag tagaggtggg	22980
gtttggcatg ttggccagcc tgggtctaaa ctctgacct cctgacctgc ctgccttggc	23040
ctcccaaagt gctgggattt cagggtgtgag ccaccacacc tggccctgat taatctttta	23100
atgcccagtc tctcttcaa aagccggctc ctttctctcc ctgccttcc tagattcctt	23160
ctccactccc caggatcagc ctctctctcc ccacccacc actgccgggg ggatgtctgt	23220
ggtcaggcat ttatcagaga ccttgagggt ggggtctttt atgtgtctgg gggatggaga	23280

gtctagagga ggtagcgttc agacctctcc atgggtgcctc tgctgggctc acatgtgacc	23340
aagcacagca aaccatgagg caggggatgg tcttgacat gagagccctt gcagcagctg	23400
ccatgggcct cagctcctct ccaagctggg aagagccctg aaaagccaag gtgttttttt	23460
ttccctcttt atttcagtgt aagtccttg agctttcttg aaccagaagt gggctcattt	23520
tgctttagag atttcaggtg ggcttgcct tgcctagca tcccagatcc acctctggg	23580
aagtcacag attggaggtg atgttggcag cttttgtaaa caaagggtag tgttctaagc	23640
tgttgtgtct gcctatgtgt gtgttttgtt acttggctc atctctgcag actggtgaca	23700
tggcttcag atatgcccga cgatgtcctg tggttgcagt gggtgacctc acagggtgtc	23760
actcgagtgc tgatgtgtct gctccccgcc tccaggtaaa tactttggct gtgggtgtgt	23820
gggccggacg ggcacctctc tcctctgatg aggcctcaca cgacattcta gaaacagctg	23880
gctgaacacc aagcaaggag cttgcccttg ggtgtgggga ccctgtctca tgggaggcag	23940
ctgagtcagt cagaggctct ggcacacctg ctgagagctg ccaccaggc caacctgaac	24000
cggagcctgg gaagacttcc cgtcggatga gtctctttga gtgcagcatt gatggtggaa	24060
gagcagagag gccccagata agcagggaaa ggtgcttcag acagagtggc tgggatgagg	24120
actggggagt gtcagatagc gctggcgtgt ctgagcgaag gagctctggc acctatggca	24180
caggaaggag gtgggacctt ggaggggcag ggctagcaga gctcctcgga gcgtgtggct	24240
aggctcctgg taatgcaagc cccctgtcct ccacctctg ttgtactgag tcacagtctc	24300
cggggtgaag cctagcagtc tgcgttgaca gccccaggg gatgccgcta ctctctgaat	24360
tctgaattct ggaaactgag ccggagtcca gggcctggct ccattacca gggttgggcg	24420
ttatcctgaa aatcataggc cttggtttcc tcaattggct aacagggggtg atccccatcc	24480
cctcaatggg ttccctgag ctctgagag cccgtagcat ggtacttggc acatgctggg	24540
catcaggagg tatggcctct cttgctattg ttgttattgg tagacacaga aggatttaaa	24600
agtaggggaa tgcaaagatc cgatttgcta gggaagaggg cagtagtggc caagtagagg	24660
gtggatcctg ggccctggct ggcagcaggc agcaaggggg gctgccaggg cccaggcagg	24720
gacgatctgt agaccgagag gcttccctaag gctcttggac aggaggaggt gtcggttcca	24780

agcctaagga gtggggcagc cctggtgact ggtggtcagt ggtgccaggc ggtgggtggt	24840
aggacaccct ggcaggcaag taggtttgtg tgggggaaac tgataggccc ctccagggat	24900
tcgttggtgg acaacacctg tgatgtccag tgggagggtg ccaggtagct gggagggcca	24960
caggcttggg agacctaggt ggtgacatca gcccagcact gagggctaga agaagctgtg	25020
tctctggctg tgacggcacc ctagagtgtg tgtggtgccc tctactggcc ggcaatgtgg	25080
gtccaccgta gctcagactg cacactgcag cagcgggaac ggcctctaag ccaacttcct	25140
ccatgtgttt caggtcctaa atgccagtga gcagccaaca ggcctcccca tgcacacctg	25200
agcaggactg gccctgctgg actccctgct cccccaaggg ctgtccagca gagaccaaa	25260
cagaggccac cccgcggtcc atcctcaggt ccagcctgaa ctcttcttg ggcaataaag	25320
tacctgctgg tgctgagggg ctctccacct ttcccagttt ttactagag aagagtctgt	25380
gagtcacttg aggaggcgag tctagcagat tctttcagag gtgctaaagt ttcccatctt	25440
tgtgcagcta cctccgcatt gctgtgtagt gaccctgcc tgtgacgtgg aggatccag	25500
cctctgagct gagttagttt tatgaaaagc taggaagcaa ctttctgcct gtgcagcgg	25560
ccagcactta actctaatac atcagcatgc gtaattcag ctggttggga aatgacacca	25620
ggaagcccag tgcagagggt cccttactga ctgtttcgtg gccctattaa tggtcagact	25680
gttccagcat gaggttctta gaatgacagg tgtttggatg ggtgggggcc ttgtgatggg	25740
gggtaggctg gcccatgtgt gatcttgttg ggtggaggga agagaatagc atgatccac	25800
ttcccatgc tgtgggaagg ggtgcagttc gtcccaaga acgacactgc ctgtcaggtg	25860
gtctgcaaag atgataacct tgactactaa aaacgtctcc atggcggggg taacaagatg	25920
ataatctact taattttaga acacctttt cacctaacta aaataatgtt taaagagttt	25980
tgtataaaaa tgtaaggaag cgttgttacc tgttgaattt tgtattatgt gaatcagtga	26040
gatgttagta gaataagcct taaaaaaaaa aaaatcggtt ggtgagctg gcacacggct	26100
gtaatcccag cactttggga ggccaagggt ggcagatcac ctgaggtcag gagttcaaga	26160
ccagtctggc caacatagca aaacctgtc tctactaaaa atacaaaaat tatctgggca	26220
tgggtggtgca tgccgtgaat ccagctatt cggaaggctg aggcaggaga atcacttgaa	26280

cccaggaggc ggagggtgcg gtgagctgag attgcacat ttcattccag cctgggcaac	26340
atgagtgaag gtctgactca aaaaaaaaaa atttaaaaaa caaaataatc tagtgtgcag	26400
ggcattcacc tcagcccccc aggagggagc caagcacagc aggagcttcc gcctcctctc	26460
cactggagca cacaacttga acctggctta ttttctgcag ggaccagccc cacatggtca	26520
gtgagtttct ccccatgtgt ggcatgaga gagtgtagaa ataaagacac aagacaaaga	26580
gataaaagaa aagacagctg ggcccggggg accactacca ccaatgcgcg gagaccggtg	26640
gtggccctga atgtctggct gcgctgttat ttattggata caaagcaaaa ggggcagggg	26700
aaagagtgtg actcatctcc aatgataggt aaggctacgt gggtcacgtg tccactggac	26760
aggggtccct tccctgcctg gcagctgagg cagagagaga gaggagacaa agagaaagac	26820
agcttacgcc attatttctg catatcagag acttttagta ctttcaataa tttactactg	26880
ctatctagaa ggagagacca ggtgtacagg atggaacatg aagggtggact aggagcgtga	26940
ccactgaagc acagcatcac agggagacag ttaggcctcc agataactgt gggcgagcct	27000
gactgatgcc aggcctcca caagaggtgg aagagcagag tcttctctaa actccccag	27060
ggaaaggag actctcttct ctcgtctgct aagtagcggg tgtgttctt tgacactttt	27120
tgctaccgt agaccacggt ccgcctggca atgggcgtct tcccagatgt tgggtgcacc	27180
gctagaccaa ggagccctct gatggccctg tccaggcata acagaaggct cgcactcctg	27240
tcttctggtc acttctcgt acgtccctc agctcctatc tctgtatggc ctggtttttc	27300
ctaggttatg attgtagagt gaggattatt ataatttgg aataaagagt aattgctaca	27360
aataatgatt aatgatattc atataatac atataaaga tctatatctg gtataactat	27420
tcttgtttta tattttatta tactggaaca gctcgtgtcc tcagtctctt gcctcagcac	27480
ctgggtggtt tgccaccac aattttccac atgcttctgg tctgcgttct tttttctcc	27540
ttgcattctc tcattctctg atccccca cctctctctg tcttccctac tctgccagcc	27600
ttgatggaga caagccctg agaccagaac tcacctttc cccaggtgtg ataactat	27660
agcaaggta gtgtaatatg actgacggtg aaacgtgtat tttttctat ttatgcattt	27720
gagtacagta cgtacaagaa aaataatggt gtgctcaaac tgttaaagt tggaagaa	27780

agatacaacc cttaccata ttgtgtaagt gccctggagt agaagaacca gcaagctcag	27840
acaaagcact tgactgagaa gacagacct ttaaaggaaa cgggttctag ggacaaactc	27900
tacgtgggcc tgttctcttg ataagaccgt gaactctttg agaaaagagg ctacttgtga	27960
aaataatgag ccccttcgg ggcaggagt ccgggggttg aacctgcctt cttacatctt	28020
gagggctaag tgagttccca aggcctctgt tcagtggttg ctccgtcagt gagctcaggt	28080
ctggtgagt gcagggctt ccaccccaa cccaccggg tgtcagagca agacactgtc	28140
ccccatggag ctggaatggg gtggaggagc ccacatctgg caccacgtg gcctccttgt	28200
gacggacca ccttgcaat gttggaaagg aaagttaaa gttcttttc ccaagtttc	28260
cagtaggctt tgttctgta gcttcacgcc ttcggtcatt agcagacata aataaacttt	28320
aaccattgtt tttatcttt ttttttttt tttagatgg agtttactc ttgttgccca	28380
ggctggagta caatggcaca atctcggctc accacaacct ccgcctccc ggttcaaacg	28440
tttctctgc ctacgcctcc caagtagatg ccaagcctcc caagtagata caggcatgtg	28500
ccaccacgcc cagctaattt ttgtatttt tagtagagat ggggtttctc caggttggtc	28560
aggctgatct cgaattccc acctcagatg atccaccgc ctcggtctcc caaagtgttg	28620
ggattccagg tgtgagccac cacgcccggc caacagtatt ttctaataac cagtatattt	28680
ccatatacat gtgtacatgg gtatttgtat tgttatcagg aaaaaatata ttaaatggct	28740
gataggagac catgggacgt atttctttc tgcctttaaa aattattcag gccgggtgcg	28800
gtggctcatg cctgtaatcc cagcccttg ggaggccaac gtggacagat cacctgaggt	28860
caggagttcg ggacaagcct ggccaacatg gtgaaacct gtcttacta aaaacacaaa	28920
aattagccag gtgtggtggc aggcgcctgt aatcccaatt agtgggttg ctgaggcagg	28980
agaatcactt gaaccagga ggtggtggt gcagtgagct gagatcgtgc cactgcaccc	29040
cagcccgggt gacagagtga gactccatc caaaaaata aaaaataaaa aataaaaaat	29100
aaattattca atcttcttta tttttattgt ttaaatgact aaagtattt ttagtagaaa	29160
cagggtcttg ctatgttacc cacgtagtc ttgaactcat tggcttaagc agtcttctg	29220
ccttagcctc ccaaagtgt gggattacag gcatgcctgg ctctccacc ttcttaaaat	29280

aagcatttgt tttataatft tttccaagtg tglatcaaga taaggaaatc aggaagtgt	29340
atatctttat agaaatggcc aaggccctcc ccttcacctg tgcctcagat gctacceaat	29400
cccgccttct ctgtccctcc agaaggcacc ctttgcttag gcctccctct cttectgaac	29460
cacctctgga agtttcttat tggcctatga atgcattctt atttcttctt atcaaataaa	29520
gccttccctt taatttatgg cacatttatg ctttggaatc cactctcagg aataatcagt	29580
atglagcata ttacacgtca ggcggcaaca ttcttttttt ttttttttt ttttgaggca	29640
gggtcccgtc ctgtcatcca ggctagagta cggtaggtgca atcatagttc actgcagcct	29700
caacttcttg gggtaagcc atcttccac ctacgtctcc caagtagctg gaaccacatg	29760
tgtgcactac cacaccagc tagttttttt ttgtagagac agggccttgc cttgttgccc	29820
aggctggtct ccaagtcctg ggctcaagtg atgtctctgc cttggccttc caaagtgtc	29880
ggattacagg tgtgagctac catgcctggt ccaacattct tcatttggt	29940
cttagtgag agtatgagcc tgattttgtt taaaaaaaa atgtgtgtgg gtgtgtatat	30000
gtatctttga gtgtatataa aaagactgaa agagggctgg gcacgggtggc tcatgcctgt	30060
aatcccagca ctttgggagg ctgagggagg cggatcactt aagtcaggag tttagacca	30120
gactgggtga aaccccatct ctactaaaa atgcaaaaat tagctgggca tggtagcggg	30180
cacctgtaat ccagcaacc agggaggctg aggcaggaga atcattgaa ccaggagg	30240
ggaggttgca gtgaccgag atgcagtgag actccacctc aaaaaaaaa aaaaaaaaa	30300
aaaaaaaaagac taaggatata tatcaaaacc ctatggcag actgttattt gtaattgtat	30360
tttatttgtc gtgcttatat gtgttgccca agtttctatg gtgaacggta tgcattcatt	30420
tcagcatgag aaaataactc ctaataaacg tgattcttaa aggactctcc ctgtgtacat	30480
cctttccaag gagccccgat gtacctgtc tccctcacag ccaagctct ctaggacagt	30540
cttccctagg gggttacggc cttgtctctt tgatggccct gccacagccc aggggtctct	30600
tcctgggcac tgtggaccag accctctag aatccctctc cttectcaac ccagactct	30660
caggcacccc atctctatcc tggacaccga gcttgtcacc aagggccagc tgcagctgt	30720
gtgtgtagt tgcacagcca cctctgggaa ggtgtgtct cccctgagga cctgggtct	30780

cagtctctga ctctgggggg attcggggcc acctaccac ctcttggtc tactcaacac	30840
cagcagcccc tcaacatcaa gccctccagc tcacagcacc tcagctctgc agctccaaag	30900
ccaccccagc ctggaactgg ggactcaggg agactccctc gctccaactc cagctgggcc	30960
cagcactgcc tctgctgtca tctctggaat ctgggtctctt gtccccagcc cactgctgcc	31020
agggtcagcc ctggctactt ctacctgggt tcttgcaaca gcttccctct gggggccgcc	31080
tgttttcagc ctggggccca tctgccctcc acgttgctgc tgggcaagct gagggccac	31140
cacaccccca gcaccttctt gtgcctccag gccctccctg ccagtacacc cctccagcc	31200
cctgaagccc tgtcagcagc tcagagcctt tccccggagt caccctgctt cccgagggga	31260
cccacgttgc tgctgggcaa gctgaggccc cgcacaacc ccagcgctt cctctgcctc	31320
cagactccct cctagcacac cctctccagc tcttgcatc ccaccagcag ctgagagcct	31380
cttccctgag tcacctgct tcccgagggg acctccacc agggaatgcc cttccaggct	31440
cctctcactg attcaccttc actcctcaga ggtcaggcgc tggctgatag aggcaatgag	31500
gtgagccct caccicaggg cgtcagccc ctgggaaggt gatgaaaaag ggcaccccaa	31560
ggggtgtccc aaactaatag gtggatgact cccgtgggaa gatccagtct cccctccca	31620
tggccaatta aatttgggggt gttttcttt actttttga ggcaaggtct tgctttgttg	31680
ctcaggctgg agtgcagtgg cacaatcaca gctcactgca gccttgacct cctgggctca	31740
agcaatcctc ctccctcagc ttcctgagga ggttttaatt aaataaatta aaagctaatt	31800
aaaaacattt ttttttttt ttggtagaga tggggtctca ctgttttcca ggctgatctt	31860
gaactcctgg actcaagcaa tcctcttgct tcagcctctg gactagctgg gactacaggt	31920
gcttgctact atgccagct atttttttta ttttttatt ttattttgta gtgatgggg	31980
gtgtttccta ggctgatctt gaactcctgg gctcaagcaa tcctcctgcc tcggcctccc	32040
aaagtgtga gattataggt atgagccatt gcactcagcc tggattgtat taaggaaact	32100
agcttagtca ctaaacctga ctctacttc tgattggaca agattggcac tttgtaaacc	32160
aggttttctg ggatgtcgtt ttccttgaag atgtttctag ctggtattat catataggat	32220
aggetgagtt atgctgcatt aacaagcaaa acccaaaagg tttatttctc attcgtgctg	32280

tatgtccagc aaatgtggct gggcttcatt ttaagtcgtc ctcactccca gacctagcct	32340
gtaggtgccc caccattggg ggatcgtctga ttgccatggc atggttagag aaatatggtt	32400
cttaaagggt ctcattccaga gtggcacatc tctcttctgc tcacaatgtg ttgaccaaag	32460
caagtcacat ggatgggagc agggagatgc aatcctctct tgtgccc aaa agaggagcac	32520
aagaaatact gttgaatagc attgccagag gccacagaaa aatctccaaa accaaaaatc	32580
tctatgacct aataaattca agaaatactg ggltaaagag aaggaaacca gtatatgcac	32640
tgtgagactt ctcatctttt attatataca ttgtaacct cacagacagc ctttaata	32700
tacatcttaa ctatcacaga cagccttcag tatattatat acattataac catcacagac	32760
agccttcaat atattatata cattataacc atcacagaca gcctttaata tatacattat	32820
aactatcaca gcctttaata tattatgtac attgtaacta tcacagcctt taatatatta	32880
tatacattgt aactaccacc gcctttaata tagtataccc attgtaacta tcacagcctt	32940
taatatacac attgtaact accacagaca gcctttaata tattatatac attgtaacta	33000
tcacagatag cctttaatat atacattgta actatcgcag acagcccttt gtttgagggt	33060
aaagcatgtg actttgtttt cctctgttc cctctgccat cctccagggc ctcacacaca	33120
ataggctctc aaatattgca accatcttgc actctgcagg gcaacctcat ggcttatcct	33180
ttacaagtgg catactcaga agaataacga ggaagaaagt gtaagaaaag agggctgttt	33240
gggcaaagaa aatctggttg attcgaatgt tacagagtgc caggcccat gcttgatctc	33300
atgaggctct cagaccttat gccttaggct atcatttcca ttttacagat aaggaattga	33360
ggctcaggga actgagagtg agggaaaggc aggggcctgg ctggtgctgg gttctgtctc	33420
ttccaggca agaagggaca tgtggacttg aatatttagc tcagggatgt tggaggccta	33480
gggtgctgct atttaaatgg	33500

- <210> 2
- <211> 16
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>

<223> 人工序列描述：合成寡核苷酸

<400> 2
ctttattcaa tgtggc 16

<210> 3
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成寡核苷酸

<400> 3
tttttagtag tcaagg 16

<210> 4
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成寡核苷酸

<400> 4
cgtttttagt agtcaa 16

<210> 5
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成寡核苷酸

<400> 5
ttggatatat tgggct 16

<210> 6
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成寡核苷酸

<400> 6 ctagtaa atg cttgtc	16
<210> 7 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列描述：合成寡核苷酸	
<400> 7 agaaattgca gtgccc	16
<210> 8 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列描述：合成寡核苷酸	
<400> 8 cttagaaatt gcagtg	16
<210> 9 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列描述：合成寡核苷酸	
<400> 9 taatattcag accagg	16
<210> 10 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列描述：合成寡核苷酸	
<400> 10 gtaatattca gaccag	16

<210> 11
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 12
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

<210> 13
<211> 31
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 14
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<400> 14

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Lys Leu Asp Ser
1 5 10 15

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Val Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<400> 15

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Glu Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 16

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<400> 16

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Arg Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 17
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>
<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<400> 17
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Glu Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 18
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>
<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<400> 18
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ser Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 19
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<400> 19

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ser Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 20

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<400> 20

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Glu Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 21

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<400> 21

His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Lys Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Val Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 22
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>
<223> G931

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (13)..(13)
<223> Lys(gE-palm)

<400> 22
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Lys Leu Asp Ser
1 5 10 15

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Val Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 23
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>
<223> G934

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (10)..(10)
<223> Lys(gE-palm)

<400> 23
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Glu Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 24
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>
<223> G973

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (10)..(10)
<223> Lys(gE-palm)

<400> 24
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ser Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 25
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>
<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (2)..(2)
<223> Gly或Ser

<220>

<221> 經修飾的殘基
<222> (10)..(10)
<223> Tyr或Lys

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (12)..(12)
<223> Lys、Glu、Arg或Ser

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (13)..(13)
<223> Lys或Tyr

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (15)..(15)
<223> Asp或Glu

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (16)..(16)
<223> Ser或Gly

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (17)..(17)
<223> Glu、Arg、Gln或Lys

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (18)..(18)
<223> Arg、Ser或Ala

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (20)..(20)
<223> Arg、Lys或Gln

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (21)..(21)
<223> Asp或Glu

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (23)..(23)
<223> Val或Ile

<220>

<221> 經修飾的殘基
<222> (24)..(24)
<223> Ala or Gln

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (27)..(27)
<223> Glu或Val

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (28)..(28)
<223> Ala或Lys

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (30)..(30)
<223> Gly或Arg

<400> 25
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Leu Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Trp Leu Xaa Xaa Gly Xaa
 20 25 30

<210> 26
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>
<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (10)..(10)
<223> Tyr或Lys

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (12)..(12)
<223> Lys、Glu、Arg或Ser

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (13)..(13)
<223> Lys或Tyr

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (17)..(17)
<223> Glu、Arg、Gln或Lys

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (18)..(18)
<223> Arg、Ser或Ala

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (27)..(27)
<223> Glu或Val

<400> 26
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Leu Asp Ser
1 5 10 15

Xaa Xaa Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Xaa Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 27
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>
<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (10)..(10)
<223> Tyr或Lys

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (12)..(12)
<223> Lys、Glu、Arg或Ser

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (13)..(13)
<223> Lys或Tyr

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (27)..(27)
<223> Glu或Val

<400> 27
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Leu Asp Ser
1 5 10 15

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Xaa Ala Gly Gly
 20 25 30

<210> 28
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>
<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (10)..(10)
<223> Tyr或Lys

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (12)..(12)
<223> Lys、Glu、Arg或Ser

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (13)..(13)
<223> Lys或Tyr

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (27)..(27)

<223> Glu或Val

<400> 28
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Xaa Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 29
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>
<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<400> 29
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Lys Leu Asp Ser
1 5 10 15

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Val Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 30
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>
<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<400> 30
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Lys Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Val Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 31
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>
<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (12)..(12)
<223> Lys、Glu或Arg

<400> 31
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
 20 25 30

<210> 32
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>
<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (12)..(12)
<223> Lys、Glu、Arg或Ser

<400> 32
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly

202530

<210> 33
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>
<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<400> 33
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Glu Tyr Leu Asp Ser
151015

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
202530

<210> 34
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>
<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<400> 34
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Glu Tyr Leu Asp Ser
151015

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
202530

<210> 35
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>
<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<400> 35
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Arg Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
 20 25 30

<210> 36
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<220>
<223> 嵌合 GLP-1/升糖素肽

<400> 36
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Arg Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
 20 25 30

<210> 37
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成寡核苷酸

<400> 37
tatttttggt gtatcc16

<210> 38
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成寡核苷酸

<400> 38
ggccaatacgc cgtca 16

<210> 39
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成引物

<400> 39
gaggaatcag atgaggatat ggga 24

<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成引物

<400> 40
aagcaggctg acttggttgc 20

<210> 41
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成探针

<400> 41
tcggtctctt cgactaatcc cgccaa 26

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種治療受試者中的肝病之方法，其包括向該受試者投與：

- i) 含patatin樣磷脂酶域3（PNPLA3）表現抑制劑；以及
- ii) 升糖素受體和/或升糖素樣肽-1（GLP-1）受體促效劑。

【請求項2】 如請求項1所述之方法，其中該PNPLA3表現抑制劑係與編碼PNPLA3的核酸的區域互補的反義寡核苷酸。

【請求項3】 如請求項2所述之方法，其中該反義寡核苷酸與編碼PNPLA3的核酸之核苷酸5567-5731內的位點互補。

【請求項4】 如請求項2所述之方法，其中該反義寡核苷酸與編碼PNPLA3的核酸之核苷酸5644-5731內的位點互補。

【請求項5】 如請求項2所述之方法，其中該反義寡核苷酸與編碼PNPLA3的核酸之核苷酸5567-5642內的位點互補。

【請求項6】 如請求項2所述之方法，其中該反義寡核苷酸與編碼PNPLA3的核酸之核苷酸5567-5620內的位點互補。

【請求項7】 如請求項2至6中任一項所述之方法，其中該編碼PNPLA3的核酸係mRNA。

【請求項8】 如請求項2至7中任一項所述之方法，其中該反義寡核苷酸之長度為12至30個核苷。

【請求項9】 如請求項2至7中任一項所述之方法，其中該反義寡核苷酸之長度為16至30個核苷。

【請求項10】 如請求項2至9中任一項所述之方法，其中該反義寡核苷酸包含一或多個修飾的糖部分。

【請求項11】如請求項10所述之方法，其中該一或多個修飾的糖部分係2'-去氧基、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基甲基、2'-O-甲氧基乙基、2'-氟、4'-CH(CH₃)-O-2'、4'-CH₂-O-2'、4'-(CH₂)₂-O-2'或其組合。

【請求項12】如請求項2至11中任一項所述之方法，其中該反義寡核苷酸包含一或多個修飾鹼基。

【請求項13】如請求項12所述之方法，其中該一或多個修飾鹼基係5-甲基胞嘧啶。

【請求項14】如請求項13所述之方法，其中該反義寡核苷酸中的每個胞嘧啶係5'甲基胞嘧啶。

【請求項15】如請求項2至14中任一項所述之方法，其中該反義寡核苷酸包含一或多個非天然核苷間鍵聯。

【請求項16】如請求項15所述之方法，其中該一或多個核苷間鍵聯係硫代磷酸酯鍵聯。

【請求項17】如請求項16所述之方法，其中每個核苷間鍵聯係硫代磷酸酯鍵聯。

【請求項18】如請求項2至17中任一項所述之方法，其中該反義寡核苷酸包含具有SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9和10中任一個的至少8個連續鹼基的序列。

【請求項19】如請求項2至17中任一項所述之方法，其中該反義寡核苷酸包含SEQ ID No: 2、3、4、5、6、7、8、9和10中一個。

【請求項20】如請求項2至19中任一項所述之方法，其中該反義寡核苷酸包含：

a) 由十個連接的去氧核苷組成的缺口區段；

b) 由三個連接的核苷組成的5'翼區段；以及

c) 由三個連接的核苷組成的3'翼區段；

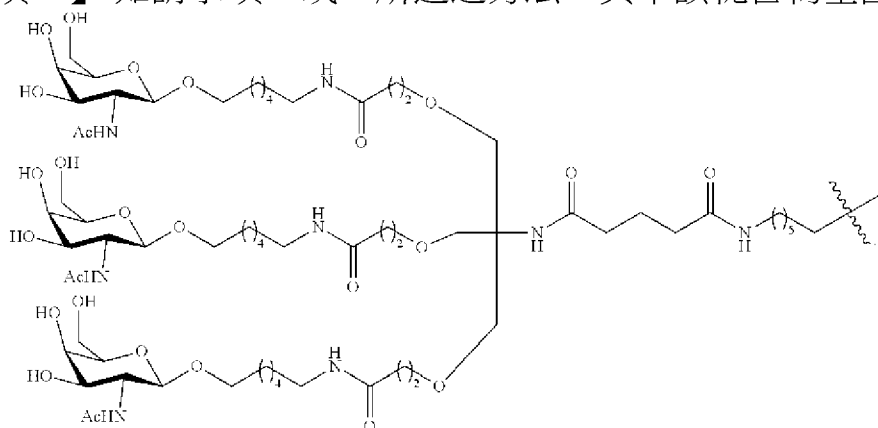
其中該缺口區段位於該5'翼區段和該3'翼區段之間，其中每個翼區段的每個核苷包含受約束的乙基糖，

其中每個核苷間鍵聯均為硫代磷酸酯鍵聯並且其中每個胞嘧啶均為5-甲基胞嘧啶。

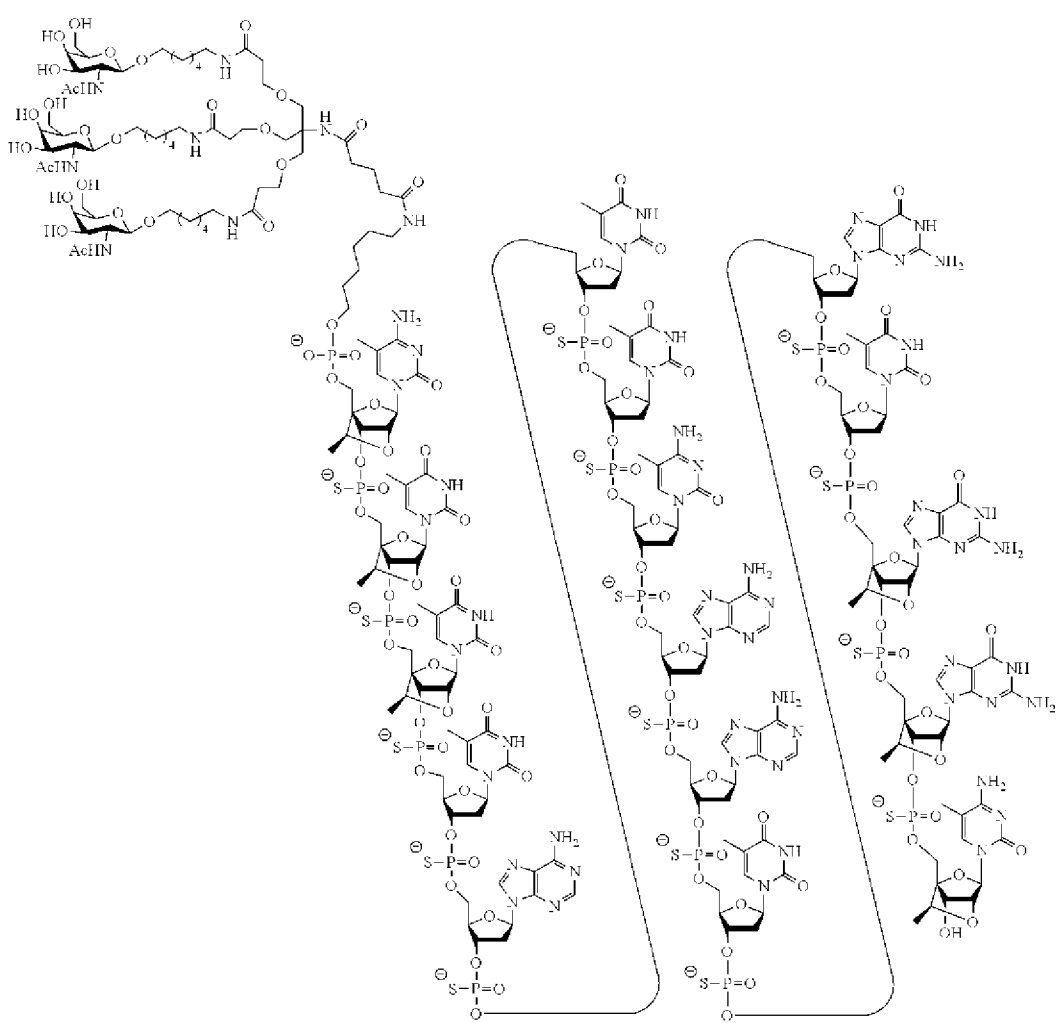
【請求項21】如請求項2至20中任一項所述之方法，其中該PNPLA3表現抑制劑還包含軛合物基團。

【請求項22】如請求項21所述之方法，其中該軛合物基團位於該反義寡核苷酸的5'末端。

【請求項23】如請求項21或22所述之方法，其中該軛合物基團係：



【請求項24】如請求項1至23中任一項所述之方法，其中該PNPLA3表現抑制劑係下式（SEQ ID NO: 2）的化合物：



或其藥學上可接受的鹽。

【請求項25】 如請求項1至24中任一項所述之方法，其中該升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑係肽。

【請求項26】 如請求項25所述之方法，其中該肽包含胺基酸序列：

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28
GX30 (SEQ ID NO: 25)

其中，

(1) X2係S，X10係Y，X12係K，X13係K，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係V，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 14) ；

(2) X2係S，X10係K，X12係E，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 15) ；

(3) X2係S，X10係K，X12係K，X13係Y，X15係E，X16係G，X17係Q，X18係A，X20係K，X21係E，X23係I，X24係A，X27係E，X28係K，並且X30係R (SEQ ID NO: 20) ；

(4) X2係S，X10係K，X12係S，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係R，X18係S，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 18) ；

(5) X2係S，X10係K，X12係E，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 33) ；或者

(6) X2係S，X10係K，X12係S，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係R，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 19) 。

【請求項27】 如請求項25所述之方法，其中該肽包含胺基酸序列HSQGTFTSDKSEYLDSEARDFVAWLEAGG (SEQ ID NO: 33) 。

【請求項28】 如請求項25至27中任一項所述之方法，其中該肽還包含對該胺基酸序列中的胺基酸的修飾。

【請求項29】 如請求項28所述之方法，其中該修飾係添加鹽基部分。

【請求項30】 如請求項29所述之方法，其中該修飾係離胺酸殘基的N (ε) 基團上的棕櫚鹽基部分。

【請求項31】 如請求項30所述之方法，其中該棕櫚鹽基通過連接基與離胺酸連接。

【請求項32】如請求項31所述之方法，其中該連接基係 γ 麩胺酸。

【請求項33】如請求項1至32中任一項所述之方法，其中將該PNPLA3表現抑制劑與該升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑同時投與。

【請求項34】如請求項1至32中任一項所述之方法，其中將該PNPLA3表現抑制劑和該升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑彼此間隔不到1小時投與。

【請求項35】如請求項1至32中任一項所述之方法，其中將該PNPLA3表現抑制劑和該升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑彼此間隔不到24小時投與。

【請求項36】如請求項1至32中任一項所述之方法，其中將該PNPLA3表現抑制劑和該升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑彼此間隔不到72小時投與。

【請求項37】如請求項1至32中任一項所述之方法，其中將該PNPLA3表現抑制劑和該升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑彼此間隔不到一週投與。

【請求項38】如請求項1至32中任一項所述之方法，其中將該PNPLA3表現抑制劑和該升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑彼此間隔不到兩週投與。

【請求項39】如請求項1至38中任一項所述之方法，其中將該PNPLA3表現抑制劑腸胃外投與。

【請求項40】如請求項1至39中任一項所述之方法，其中將該PNPLA3表現抑制劑每天投與、每天投與兩次或每天投與三次。

【請求項41】如請求項1至39中任一項所述之方法，其中將該PNPLA3表現抑制劑每週投與、每週投與兩次或每週投與三次。

【請求項42】如請求項1至39中任一項所述之方法，其中將該PNPLA3表現抑制劑每月投與、每月投與兩次或每月投與三次。

【請求項43】如請求項1至42中任一項所述之方法，其中將該升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑腸胃外投與。

【請求項44】如請求項1至42中任一項所述之方法，其中將該升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑每天投與、每天投與兩次或每天投與三次。

【請求項45】如請求項1至42中任一項所述之方法，其中將該升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑每週投與、每週投與兩次或每週投與三次。

【請求項46】如請求項1至42中任一項所述之方法，其中將該升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑每月投與、每月投與兩次或每月投與三次。

【請求項47】如請求項1至46中任一項所述之方法，其中該受試者係肥胖的和/或患有2型糖尿病。

【請求項48】如請求項1至47中任一項所述之方法，其中該肝病係非酒精性脂肪肝病（NAFLD）。

【請求項49】如請求項1至47中任一項所述之方法，其中該肝病係非酒精性脂肪性肝炎。

【請求項50】如請求項1至47中任一項所述之方法，其中該肝病係肝纖維化。

【請求項51】一種減少患有肝病的受試者的肝臟中的脂肪變性之方法，其包括向該受試者投與：

- i) 含patatin樣磷脂酶域3（PNPLA3）表現抑制劑；以及
- ii) 升糖素受體和/或升糖素樣肽-1（GLP-1）受體促效劑。

【請求項52】如請求項51所述之方法，其中該PNPLA3表現抑制劑係與編碼PNPLA3的核酸的區域互補的反義寡核苷酸。

【請求項53】如請求項52所述之方法，其中該反義寡核苷酸之長度為12至30個核苷。

【請求項54】如請求項52所述之方法，其中該反義寡核苷酸之長度為16至30個核苷。

【請求項55】如請求項52至54中任一項所述之方法，其中該反義寡核苷酸包含具有SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9和10中任一個的至少8個連續鹼基的序列。

【請求項56】如請求項52至54中任一項所述之方法，其中該反義寡核苷酸包含SEQ ID No: 2、3、4、5、6、7、8、9和10中一個。

【請求項57】如請求項52至56中任一項所述之方法，其中該反義寡核苷酸包含：

- a) 由十個連接的去氧核苷組成的缺口區段；
- b) 由三個連接的核苷組成的5'翼區段；以及
- c) 由三個連接的核苷組成的3'翼區段；

其中該缺口區段位於該5'翼區段和該3'翼區段之間，其中每個翼區段的每個核苷包含受約束的乙基糖；其中每個核苷間鍵聯均為硫代磷酸酯鍵聯並且其中每個胞嘧啶均為5-甲基胞嘧啶。

【請求項58】如請求項51至57中任一項所述之方法，其中該升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑係肽。

【請求項59】如請求項58所述之方法，其中該肽包含胺基酸序列：

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28
GX30 (SEQ ID NO:25)

其中，

(1) X2係S，X10係Y，X12係K，X13係K，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係V，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 14)；

(2) X2係S，X10係K，X12係E，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 15) ；

(3) X2係S，X10係K，X12係K，X13係Y，X15係E，X16係G，X17係Q，X18係A，X20係K，X21係E，X23係I，X24係A，X27係E，X28係K，並且X30係R (SEQ ID NO: 20) ；

(4) X2係S，X10係K，X12係S，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係R，X18係S，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 18) ；

(5) X2係S，X10係K，X12係E，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 33) ；或者

(6) X2係S，X10係K，X12係S，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係R，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 19) 。

【請求項60】 如請求項51至59中任一項所述之方法，其中與單獨投與該PNPLA3表現抑制劑或該升糖素受體GLP-1受體促效劑時的總肝臟脂肪變性相比，該受試者中的總肝臟脂肪變性降低。

【請求項61】 如請求項51至59中任一項所述之方法，其中與單獨投與該PNPLA3表現抑制劑或該升糖素受體GLP-1受體促效劑時的總肝臟脂肪變性相比，該受試者中的總肝臟脂肪變性降低至少30%。

【請求項62】 如請求項51至59中任一項所述之方法，其中與單獨投與該PNPLA3表現抑制劑或該升糖素受體GLP-1受體促效劑時的總肝臟脂肪變性相比，該受試者中的總肝臟脂肪變性降低至少30%。

【請求項63】如請求項51至62中任一項所述之方法，其中該肝病係非酒精性脂肪肝病（NAFLD）。

【請求項64】如請求項51至62中任一項所述之方法，其中該肝病係非酒精性脂肪性肝炎。

【請求項65】如請求項51至62中任一項所述之方法，其中該肝病係肝纖維化。

【請求項66】一種減少患有非酒精性脂肪肝病的受試者的肝臟中的炎症之方法，其包括向該受試者投與：

- i) 含patatin樣磷脂酶域3（PNPLA3）表現抑制劑；以及
- ii) 升糖素受體和/或升糖素樣肽-1（GLP-1）受體促效劑。

【請求項67】如請求項66所述之方法，其中該PNPLA3表現抑制劑係與編碼PNPLA3的核酸的區域互補的反義寡核苷酸。

【請求項68】如請求項67所述之方法，其中該反義寡核苷酸之長度為12至30個核苷。

【請求項69】如請求項67所述之方法，其中該反義寡核苷酸之長度為16至30個核苷。

【請求項70】如請求項67至69中任一項所述之方法，其中該反義寡核苷酸包含具有SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9和10中任一個的至少8個連續鹼基的序列。

【請求項71】如請求項67至69中任一項所述之方法，其中該反義寡核苷酸包含SEQ ID No: 2、3、4、5、6、7、8、9和10中一個。

【請求項72】如請求項67至71中任一項所述之方法，其中該反義寡核苷酸包含：

- a) 由十個連接的去氧核苷組成的缺口區段；
- b) 由三個連接的核苷組成的5'翼區段；以及

c) 由三個連接的核苷組成的3'翼區段；

其中該缺口區段位於該5'翼區段和該3'翼區段之間，其中每個翼區段的每個核苷包含受約束的乙基糖；其中每個核苷間鍵聯均為硫代磷酸酯鍵聯並且其中每個胞嘧啶均為5-甲基胞嘧啶。

【請求項73】如請求項66至72中任一項所述之方法，其中該升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑係肽。

【請求項74】如請求項73所述之方法，其中該肽包含胺基酸序列：

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28
GX30 (SEQ ID NO:25)

其中，

(1) X2係S，X10係Y，X12係K，X13係K，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係V，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 14)；

(2) X2係S，X10係K，X12係E，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 15)；

(3) X2係S，X10係K，X12係K，X13係Y，X15係E，X16係G，X17係Q，X18係A，X20係K，X21係E，X23係I，X24係A，X27係E，X28係K，並且X30係R (SEQ ID NO: 20)；

(4) X2係S，X10係K，X12係S，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係R，X18係S，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 18)；

(5) X2係S，X10係K，X12係E，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 33)；或者

(6) X2係S，X10係K，X12係S，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係R，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO:19)。

【請求項75】如請求項50至58中任一項所述之方法，其中與單獨投與該PNPLA3表現抑制劑或該升糖素受體GLP-1受體促效劑時的肝臟炎症相比，該受試者中的肝臟炎症減少至少50%。

【請求項76】一種減少患有肝病的受試者中的肝膠原之方法，其包括向該受試者投與：

- i) 含patatin樣磷脂酶域3 (PNPLA3) 表現抑制劑；以及
- ii) 升糖素受體和/或升糖素樣肽-1 (GLP-1) 受體促效劑。

【請求項77】如請求項76所述之方法，其中該PNPLA3表現抑制劑係與編碼PNPLA3的核酸的區域互補的反義寡核苷酸。

【請求項78】如請求項77所述之方法，其中該反義寡核苷酸之長度為12至30個核苷。

【請求項79】如請求項77所述之方法，其中該反義寡核苷酸之長度為16至30個核苷。

【請求項80】如請求項77至79中任一項所述之方法，其中該反義寡核苷酸包含具有SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9和10中任一個的至少8個連續鹼基的序列。

【請求項81】如請求項77至79中任一項所述之方法，其中該反義寡核苷酸包含SEQ ID No: 2、3、4、5、6、7、8、9和10中一個。

【請求項82】如請求項77至81中任一項所述之方法，其中該反義寡核苷酸包含：

- a) 由十個連接的去氧核苷組成的缺口區段；
- b) 由三個連接的核苷組成的5'翼區段；以及
- c) 由三個連接的核苷組成的3'翼區段；

其中該缺口區段位於該5'翼區段和該3'翼區段之間，其中每個翼區段的每個核苷包含受約束的乙基糖；其中每個核苷間鍵聯均為硫代磷酸酯鍵聯並且其中每個胞嘧啶均為5-甲基胞嘧啶。

【請求項83】如請求項76至82中任一項所述之方法，其中該升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑係肽。

【請求項84】如請求項83所述之方法，其中該肽包含胺基酸序列：

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28
GX30 (SEQ ID NO:25)

其中，

(1) X2係S，X10係Y，X12係K，X13係K，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係V，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 14)；

(2) X2係S，X10係K，X12係E，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 15)；

(3) X2係S，X10係K，X12係K，X13係Y，X15係E，X16係G，X17係Q，X18係A，X20係K，X21係E，X23係I，X24係A，X27係E，X28係K，並且X30係R (SEQ ID NO: 20)；

(4) X2係S，X10係K，X12係S，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係R，X18係S，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 18) ；

(5) X2係S，X10係K，X12係E，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 33) ；或者

(6) X2係S，X10係K，X12係S，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係R，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO:19) 。

【請求項85】 如請求項50至84中任一項所述之方法，其中與單獨投與該PNPLA3表現抑制劑或該升糖素受體GLP-1受體促效劑時的肝膠原相比，該受試者中的肝膠原減少至少25%。

【請求項86】 如請求項50至85中任一項所述之方法，其中該受試者係肥胖的和/或患有2型糖尿病。

【請求項87】 如請求項50至85中任一項所述之方法，其中該肝病係非酒精性脂肪性肝炎。

【請求項88】 如請求項50至85中任一項所述之方法，其中該肝病係肝纖維化。

【請求項89】 一種藥學上可接受的組成物，其包含：

- i) 含patatin樣磷脂酶域3 (PNPLA3) 表現抑制劑；
- ii) 升糖素受體和/或升糖素樣肽-1 (GLP-1) 受體促效劑；
- iii) 至少一種藥學上可接受的賦形劑。

【請求項90】 如請求項89所述之組成物，其中該PNPLA3表現抑制劑係與編碼PNPLA3的核酸的區域互補的反義寡核苷酸。

【請求項91】如請求項90所述之組成物，其中該反義寡核苷酸包含具有SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9和10中任一個的至少8個連續鹼基的序列。

【請求項92】如請求項90所述之組成物，其中該反義寡核苷酸包含SEQ ID No: 2、3、4、5、6、7、8、9和10中一個。

【請求項93】如請求項90至92中任一項所述之組成物，其中該反義寡核苷酸包含：

- a) 由十個連接的去氧核苷組成的缺口區段；
- b) 由三個連接的核苷組成的5'翼區段；以及
- c) 由三個連接的核苷組成的3'翼區段；

其中該缺口區段位於該5'翼區段和該3'翼區段之間，其中每個翼區段的每個核苷包含受約束的乙基糖；其中每個核苷間鍵聯均為硫代磷酸酯鍵聯並且其中每個胞嘧啶均為5-甲基胞嘧啶。

【請求項94】如請求項89至93中任一項所述之組成物，其中該升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑係肽。

【請求項95】如請求項94所述之組成物，其中該肽包含胺基酸序列：

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28
GX30 (SEQ ID NO:25)

其中，

(1) X2係S，X10係Y，X12係K，X13係K，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係V，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 14)；

(2) X2係S，X10係K，X12係E，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 15)；

(3) X2係S，X10係K，X12係K，X13係Y，X15係E，X16係G，X17係Q，X18係A，X20係K，X21係E，X23係I，X24係A，X27係E，X28係K，並且X30係R (SEQ ID NO: 20) ；

(4) X2係S，X10係K，X12係S，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係R，X18係S，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 18) ；

(5) X2係S，X10係K，X12係E，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 33) ；或者

(6) X2係S，X10係K，X12係S，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係R，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 19) 。

【請求項96】如請求項89至95中任一項所述之組成物，其中該組成物被配製用於腸胃外投與。

【請求項97】一種套組，其包含：

- i) 含patatin樣磷脂酶域3 (PNPLA3) 表現抑制劑；以及
- ii) 升糖素受體和/或升糖素樣肽-1 (GLP-1) 受體促效劑。

【請求項98】如請求項97所述之套組，其中該PNPLA3表現抑制劑係與編碼PNPLA3的核酸的區域互補的反義寡核苷酸。

【請求項99】如請求項98所述之套組，其中該反義寡核苷酸包含具有SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9和10中任一個的至少8個連續鹼基的序列。

【請求項100】如請求項98所述之套組，其中該反義寡核苷酸包含SEQ ID No: 2、3、4、5、6、7、8、9和10中一個。

【請求項101】如請求項98至100中任一項所述之套組，其中該反義寡核苷酸包含：

- a) 由十個連接的去氧核苷組成的缺口區段；
- b) 由三個連接的核苷組成的5'翼區段；以及
- c) 由三個連接的核苷組成的3'翼區段；

其中該缺口區段位於該5'翼區段和該3'翼區段之間，其中每個翼區段的每個核苷包含受約束的乙基糖；其中每個核苷間鍵聯均為硫代磷酸酯鍵聯並且其中每個胞嘧啶均為5-甲基胞嘧啶。

【請求項102】如請求項97至101中任一項所述之套組，其中該升糖素受體和/或GLP-1受體促效劑係肽。

【請求項103】如請求項102所述之套組，其中該肽包含胺基酸序列：

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28
GX30 (SEQ ID NO:25)

其中，

(1) X2係S，X10係Y，X12係K，X13係K，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係V，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 14) ；

(2) X2係S，X10係K，X12係E，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G (SEQ ID NO: 15) ；

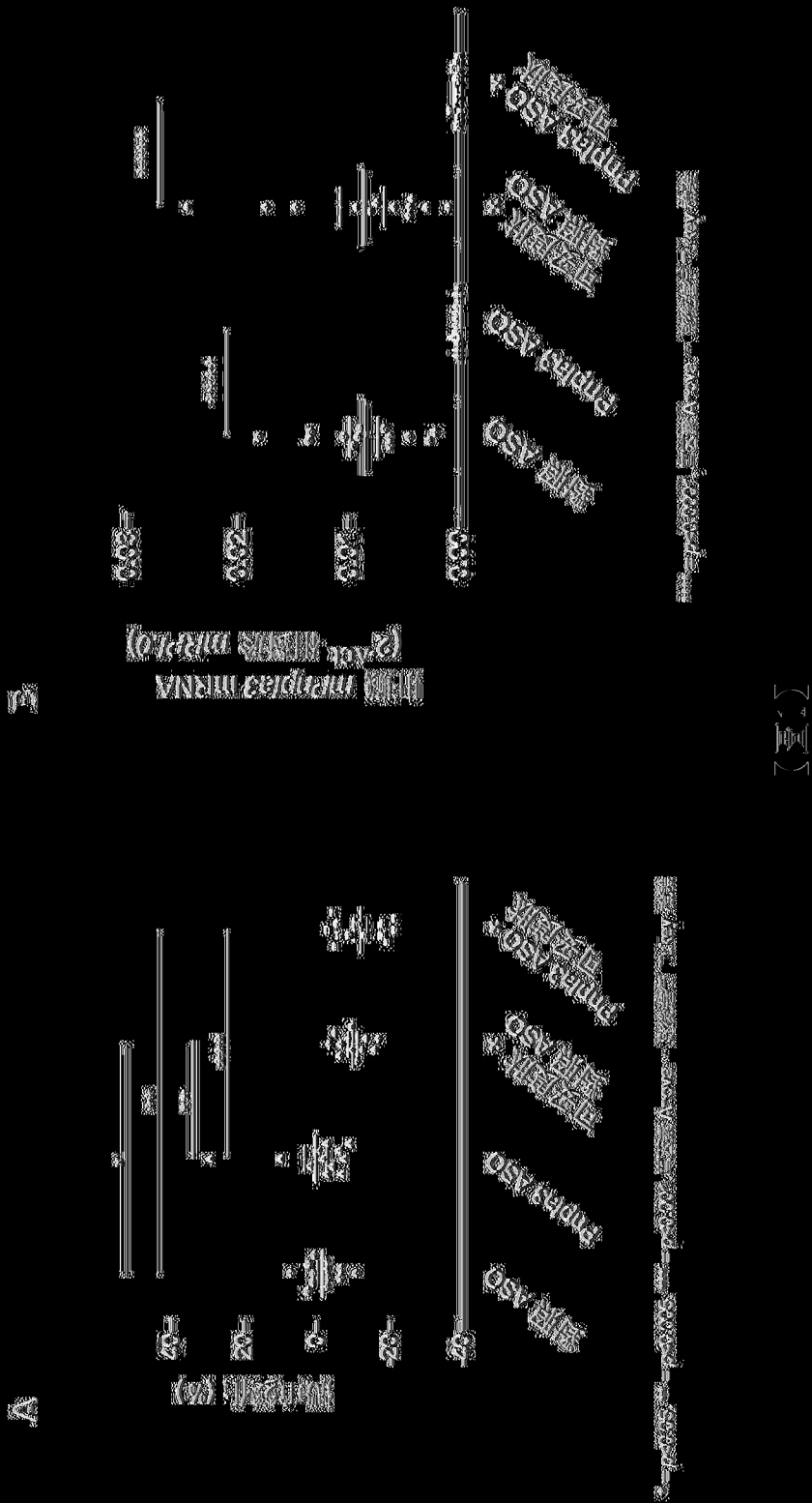
(3) X2係S，X10係K，X12係K，X13係Y，X15係E，X16係G，X17係Q，X18係A，X20係K，X21係E，X23係I，X24係A，X27係E，X28係K，並且X30係R (SEQ ID NO: 20) ；

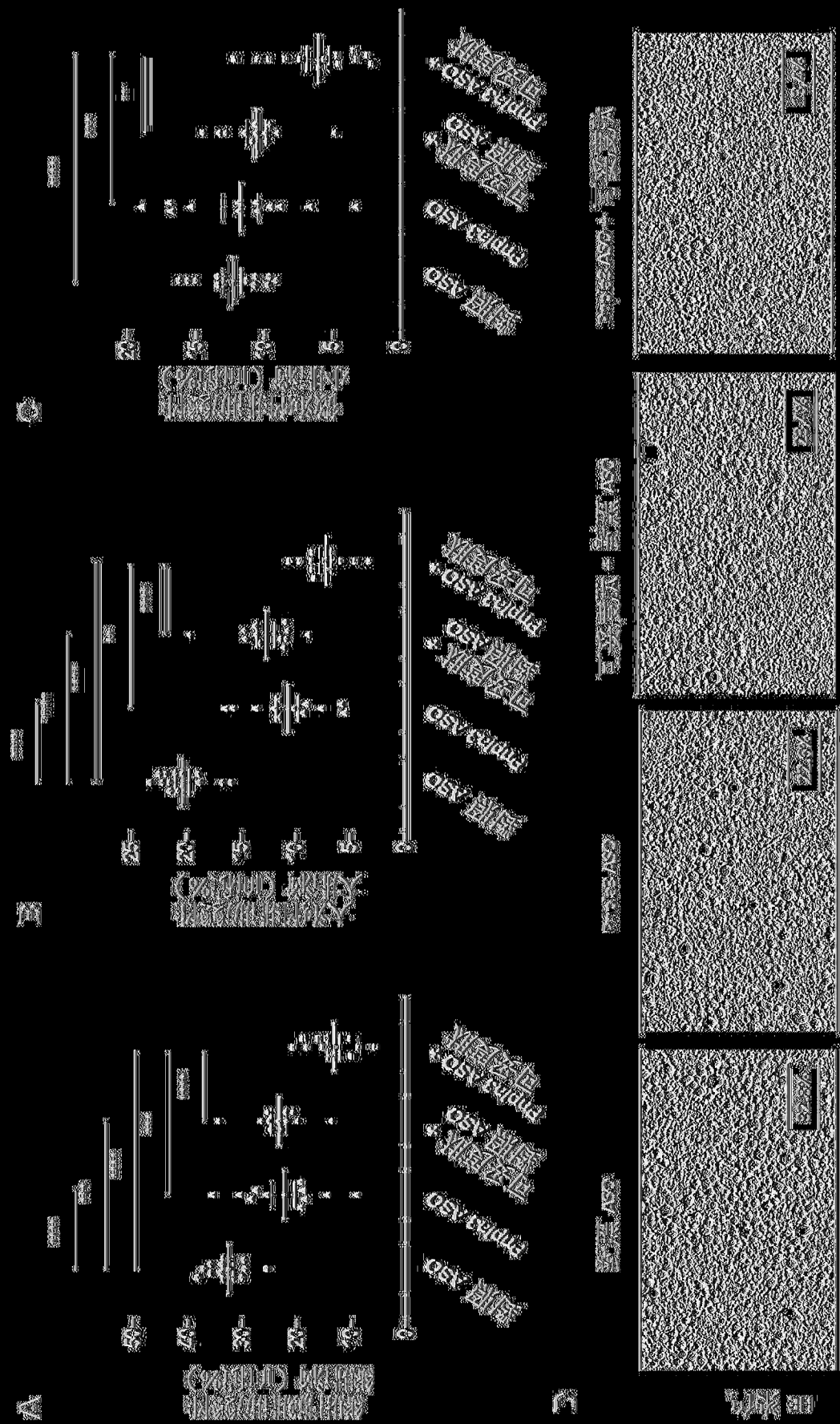
(4) X2係S，X10係K，X12係S，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係R，X18係S，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G（SEQ ID NO: 18）；

(5) X2係S，X10係K，X12係E，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係E，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G（SEQ ID NO: 33）；或者

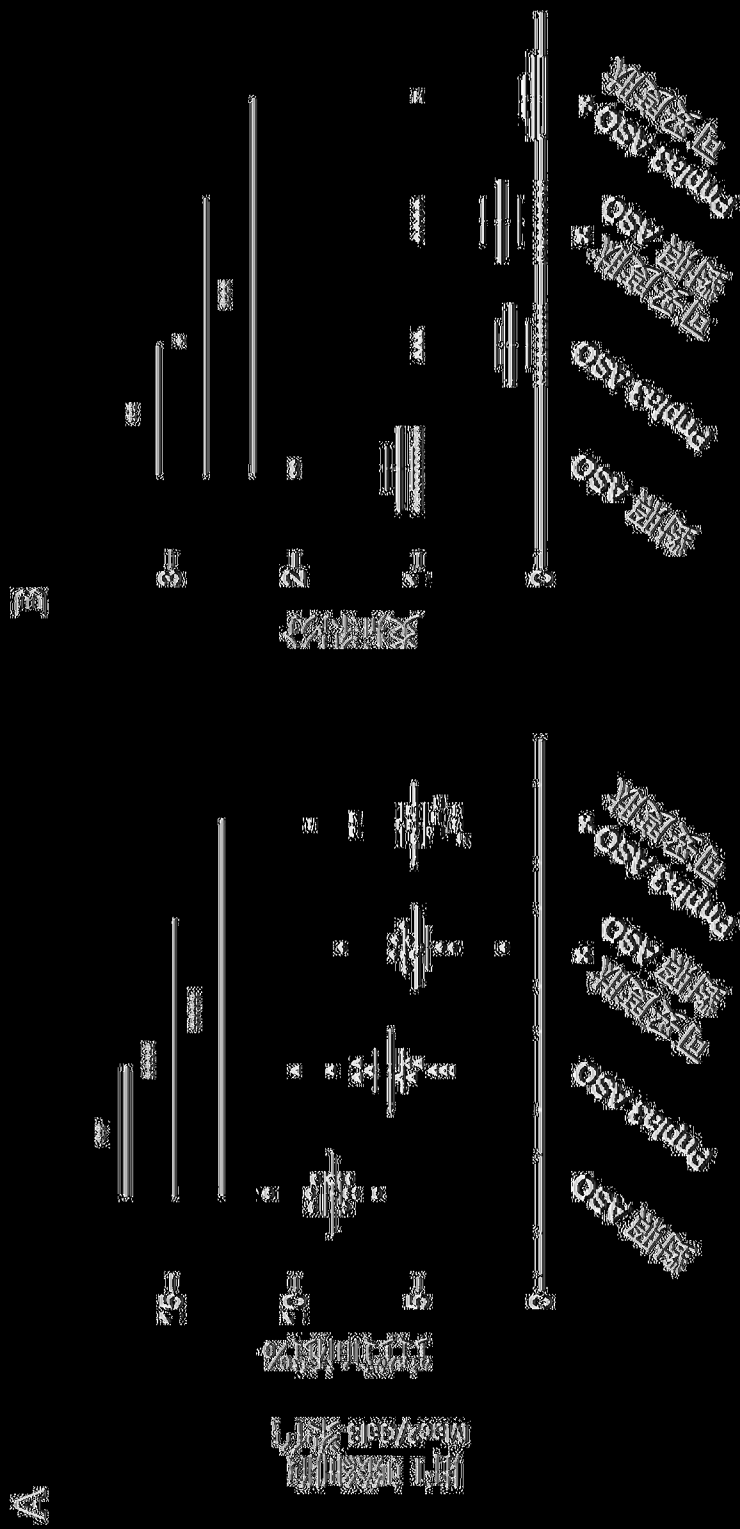
(6) X2係S，X10係K，X12係S，X13係Y，X15係D，X16係S，X17係R，X18係R，X20係R，X21係D，X23係V，X24係A，X27係E，X28係A，並且X30係G（SEQ ID NO:19）。

〔發明圖式〕

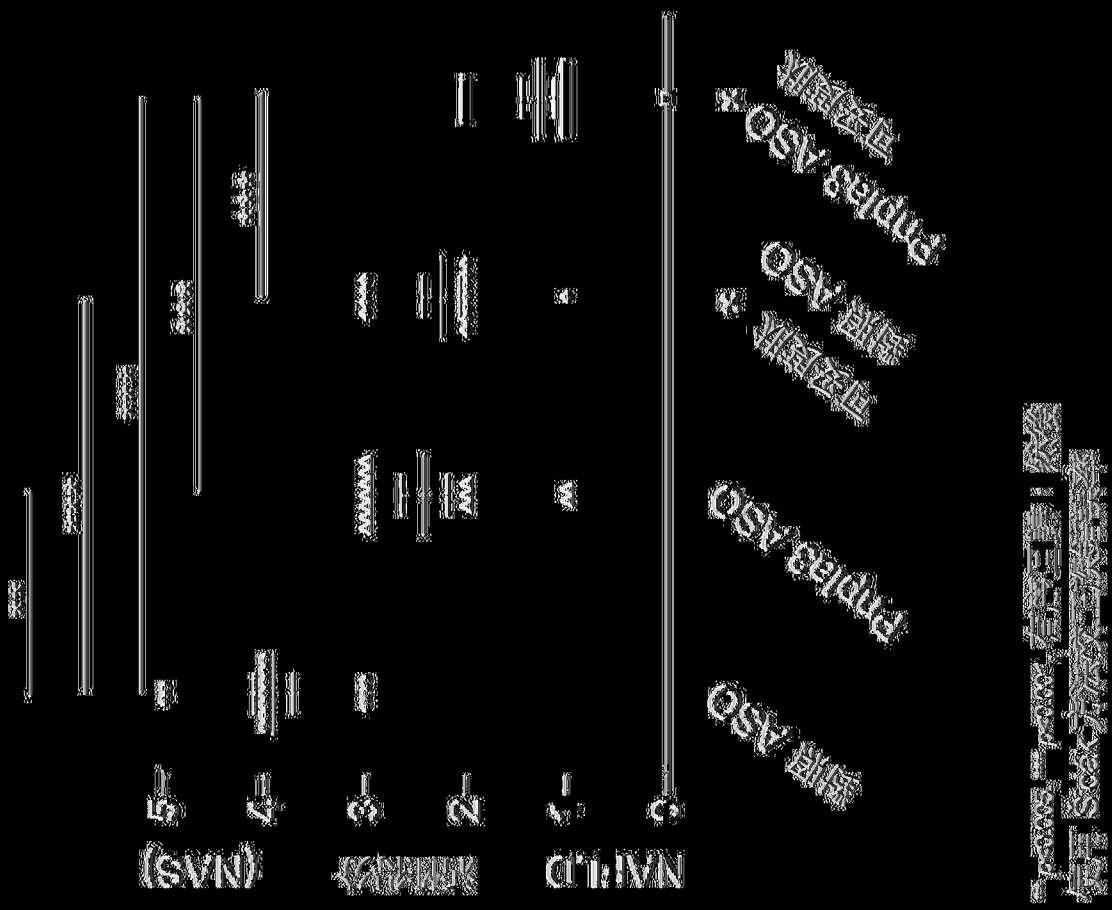




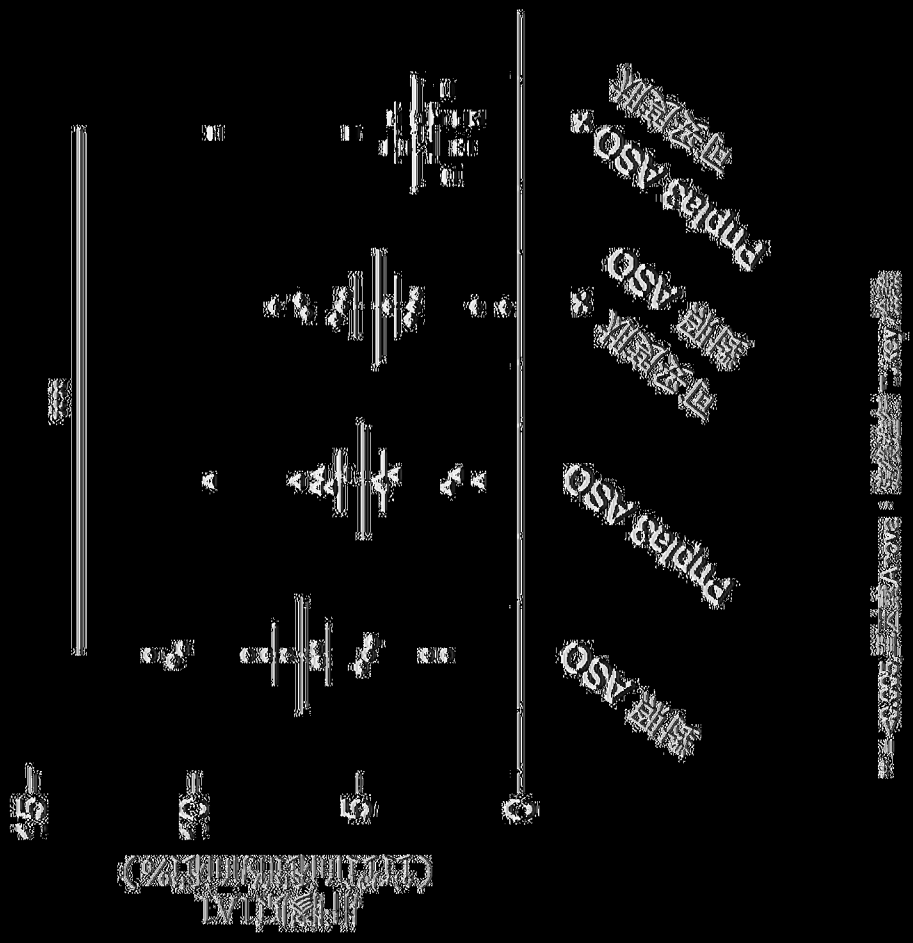
【圖2】



(A)



[75]



[25]